



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 339 789**

51 Int. Cl.:
C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05790352 .8**

96 Fecha de presentación : **19.07.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1771474**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.04.2007**

54 Título: **Inhibidores de proteína 4 de tipo angiopoyetina, combinaciones y su utilización.**

30 Prioridad: **20.07.2004 US 589782 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.05.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.05.2010

73 Titular/es: **GENENTECH, Inc.**
1 DNA Way
South San Francisco, California 94080-4990, US

72 Inventor/es: **Ferrara, Napoleone;**
Gerber, Hans-Peter y
Liang, Xiao Huan

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

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 proteína 4 de tipo angiopoyetina, combinaciones y su utilización.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere en general al tratamiento de enfermedades humanas y condiciones patológicas, como el cáncer. La invención se refiere a inhibidores de la proteína 4 de tipo angiopoyetina (ANGPTLA) y combinaciones de y a inhibidores de ANGPTL4 con otros agentes terapéuticos y procedimientos de utilización de tales composiciones para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades o condiciones patológicas.

Antecedentes de la invención

El cáncer es una causa principal de muerte en los Estados Unidos. Se han utilizado varios tipos de terapias para tratar el cáncer. Por ejemplo, los procedimientos quirúrgicos se usan para eliminar los tejidos cancerosos o muertos. La radioterapia, que trabaja mediante la reducción de los tumores sólidos, y la quimioterapia, que mata células en rápida división, se utilizan como terapias para el cáncer.

En 1971, Folkman propuso que la anti-angiogénesis podría ser una estrategia eficaz contra el cáncer. Folkman, N. Engl. J. Med 285, 1182-1186 (1971). La angiogénesis es el desarrollo de nuevo tejido vascular a partir de los vasos sanguíneos preexistentes y/o de células madre endoteliales en circulación (*véase, por ejemplo*, Ferrara y Alitalo, Nature Medicine 5(12):1359-1364 (1999)). La angiogénesis es una cascada de procesos que consiste en 1) la degradación de la matriz extracelular de un sitio local después de la liberación de la proteasa, 2) la proliferación de células endoteliales capilares, y 3) la migración de los túbulos capilares hacia el estímulo angiogénico. Ferrara *et al.* Endocrine Rev. 13:18-32 (1992).

El crecimiento de nuevos vasos sanguíneos es un requisito previo durante los procesos fisiológicos normales del desarrollo embrionario y postnatal, por ejemplo, la embriogénesis, la cicatrización de heridas y la menstruación. *Véase, por ejemplo*, Folkman y Klagsbrun Science 235:442-447 (1987). Esa proliferación de nuevos vasos sanguíneos a partir de capilares pre-existentes, juega además un papel clave en el desarrollo patológico de una variedad de trastornos, incluyendo pero no limitándose a, por ejemplo, tumores, retinopatías proliferativas, degeneración macular relacionada con la edad, psoriasis, inflamación, diabetes, y artritis reumatoide (AR). *Véase, por ejemplo*, Ferrara, Recent Prog. Horm. Res. 55:15-35 (2000), discusión 35-6.

En vista de la notable importancia fisiológica y patológica de la angiogénesis, se ha dedicado mucho trabajo a la elucidación de los factores capaces de regular este proceso. Se sugiere que el proceso de angiogénesis es regulado por un equilibrio entre moléculas pro y anti-angiogénicas, y se transformó en diversas enfermedades, especialmente el cáncer. *Véase, por ejemplo*, Carmeliet y Jain Nature 407:249-257 (2000).

Por ejemplo, la angiogénesis es dependiente de factores secretados como factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF, también conocido como factor de permeabilidad vascular (VPF)) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). *Véase, por ejemplo*, Ferrara y Davis-Smyth Endocrine Rev. 18:4-25 (1997), y, Ferrara J. Mol. Med. 77:527-543 (1999). Además de ser un factor angiogénico en la angiogénesis y vasculogénesis, el VEGF, como un factor de crecimiento pleiotrópico, exhibe múltiples efectos biológicos en otros procesos fisiológicos, como la supervivencia de células endoteliales, permeabilidad de los vasos y la vasodilatación, la quimiotaxis de los monocitos y flujo de entrada de calcio. Ferrara y Davis-Smyth (1997), *supra*. Además, los estudios han reportado efectos mitógenos del VEGF en algunos pocos tipos de células no endoteliales, como las células del epitelio pigmentario de la retina, células de los conductos pancreáticos y células de Schwann. *Véase, por ejemplo*, Guerin *et al.* J. Cell Physiol. 164:385-394 (1995); Oberg-Gales *et al.* Mol. Cell. Endocrinol. 126:125-132 (1997), y, Sondell *et al.* J. Neurosci. 19:5731-5740 (1999).

El VEGF pertenece a una familia de genes que incluye el factor de crecimiento placentario (PIGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y VEGF-E. Estos ligandos se unen a y ligan a los receptores de la tirosina quinasa expresados en las células endoteliales. Por ejemplo, la familia del receptor tirosina quinasa VEGF incluye Flt1 (VEGF-R1) (que une ligandos VEGF, VEGF-B y PIGF), Flk1/KDR (VEGF-R2) (que une VEGF, VEGF-C, VEGF-D, y, VEGF-E), y FLT4 (VEGF-R3) - (que se une VEGF-C y VEGF-D). *Véase, por ejemplo*, Ferrara *et al.*, Nature Medicine.9(6):669-676 (2003), y, Robinson & Stringer, Journal of Cell Science, 114(5):853-65 (2001).

Las angiopoyetinas son otro grupo de factores de crecimiento para el endotelio vascular. *Véase, por ejemplo*, Davis *et al.*, Cell, 87:1161-1169 (1996); Suri *et al.*, Cell, 87:1171-1180 (1996); Maisonpierre *et al.* Science 277:55-60 (1997), y Valenzuela *et al.*, Proc. Natl. Acad. EE.UU. 96:1904-1909 (1999). Angiopoyetinas parecen funcionar de manera complementaria y coordinada con VEGF, donde el VEGF actúa en el desarrollo vascular, mientras que angiopoyetinas actúan más probablemente mediante la modulación de la remodelación, maduración y estabilización de la vasculatura. *Véase, e.g.*, Holash *et al.*, Oncogene 18:5356-5362 (1999). Angiopoyetina 1, angiopoyetina 2, angiopoyetina 3 y angiopoyetina 4 se unen a los receptores tirosina quinasa Tie2 (también conocidos como Tek), que son receptores que se encuentran en las células endoteliales. *Véase, por ejemplo*, Ward & Dumont, Seminars in Cell & Developmental Biology, 13:19-27 (2002). Hay también un receptor huérfano de Tiel.

La angiogénesis no sólo depende de factores de crecimiento, sino que también está influenciada por las moléculas de adhesión celular (CAMs), incluyendo las integrinas, uniéndose a sus ligandos presentes en la matriz extracelular. Véase, por ejemplo, Ferrara y Alitalo, *Nature Medicine* 5(12):1359-1364 (1999), y, Carmeliet, *Nature Medicine*, 6 (3):389-395 (2000). Las integrinas facilitan la adhesión celular y la migración de las proteínas de la matriz extracelular en los espacios intercelulares y las membranas basales. La familia de las integrinas de las proteínas de adhesión celular se compone de al menos 18 subunidades α y 8 β que se expresan en al menos 22 combinaciones heterodiméricas $\alpha\beta$. Véase, por ejemplo, Byzova *et al.*, *Mol. Cell.*, 6(4):851-860 (2000), y, Hood y Chersesh, *Nature Reviews*, 2:91-99 (2002). Entre estos, por lo menos seis ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$ y $\alpha_1\beta_1$) de las combinaciones han sido implicadas en la angiogénesis (véase, por ejemplo, Hynes y Bader, *Thromb. Haemost.*, 78 (1):83-87 (1997), y, Hynes *et al.*, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 32 (5):501-510 (1999)). La inactivación de diferentes genes que codifican receptores de adhesión específicos o la administración de anticuerpos bloqueantes en modelos animales ha tenido profundos efectos en la respuesta angiogénica de las células endoteliales. Véase, por ejemplo, Elicieri y Chersesh, *Mol. Med.*, 4:741-750 (1998).

Estas moléculas han sido objetivo de las terapias del cáncer. Por ejemplo, el reconocimiento de VEGF como regulador primario de la angiogénesis en condiciones patológicas ha conducido a numerosos intentos de bloquear las actividades de VEGF. Anticuerpos receptores anti-VEGF inhibidores, construcciones solubles, estrategias antisentido, aptámeros ARN contra el VEGF e inhibidores quinasa tirosina receptor VEGF de bajo peso molecular (RTK) han sido propuestos para su uso en la interferencia de la señalización VEGF. Véase, por ejemplo, Siemeister *et al.* *Cancer Metastasis Rev.* 17:241-248 (1998). Anticuerpos neutralizantes anti-VEGF han demostrado que inhiben el crecimiento de una variedad de líneas celulares de tumores humanos en ratones nude (Kim *et al.* *Nature* 362:841-844 (1993); Warren *et al.* *J. Clin. Invest.* 95:1789-1797 (1995); Borgstrom *et al.* *Cancer Res.* 56:4032-4039 (1996), y Melnyk *et al.* *Cancer Res.* 56:921-924 (1996)) y también inhibir la angiogénesis intraocular en los modelos de trastornos de isquemia de la retina (Adamis *et al.* *Arco. Ophthalmol.* 114:66-71 (1996)). De hecho, un anticuerpo anti-VEGF humanizado, bevacizumab (Avastin®, Genentech) ha sido aprobado por la FDA de los EE.UU. como tratamiento de primera línea para el cáncer colorrectal metastásico. Ver, por ejemplo, Ferrara *et al.*, (2004 *Nature Reviews Drug Discovery*, 3: 391-400).

Sin embargo, los procedimientos actuales de tratamiento del cáncer no son siempre óptimos. A menudo, un único tipo de terapia no puede suprimir por completo una condición patológica. Por ejemplo, los procedimientos quirúrgicos a menudo no pueden eliminar todo el crecimiento canceroso. Otros tratamientos del cáncer, tales como la quimioterapia, tienen numerosos efectos secundarios, y/o la terapia se vuelve ineficaz, por ejemplo, porque el cáncer desarrolla una resistencia a la droga o el tratamiento. La inhibición del VEGF o un receptor de VEGF, o del sistema receptor de Tie2 a veces no suprime completamente el crecimiento del tumor. Véase, por ejemplo, Gerber *et al.*, *Cancer Research*, 60:6253-6258 (2000); Ferrara *et al.*, *Nature Reviews: Drug Discovery*, 3:391-400 (2004); Millauer *et al.*, *Nature* 367, 576-579 (1994); Kim *et al.*, *Nature* 362: 841-844 (1993); Millauer *et al.*, *Cancer Res.* 56:1615-1620 (1996); Goldman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 95:8795-8800 (1998); Asano *et al.*, *Cancer Research*, 55:5296-5301 (1995); Warren *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 95:1789-1797 (1995); Fong *et al.*, *Cancer Res.* 59:99-106 (1999); Wedge, *et al.*, *Cancer Res.* 60:970-975 (2000); Wood *et al.* *Cancer Res.* 60:2178-2189 (2000); Siemeister *et al.*, *Cancer Res.* 59:3185-3191 (1999); Lin *et al.*, *J. Clin. Invest.* 103:159-165 (1999); Lin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 95:8829-8834 (1998), y, Siemeister *et al.*, *Cancer Res.* 59, 3185-3191, (1999).

Por lo tanto, hay una necesidad urgente de terapias nuevas y más eficaces para la regulación de los cánceres. La invención se ocupa de estas y otras necesidades, como se desprende, previo examen de la divulgación siguiente.

Descripción de la invención

La invención se refiere a los inhibidores de la proteína 4 de tipo angiopoyetina (ANGPTL4) y procedimientos de utilización de estos inhibidores para tratar enfermedades y condiciones patológicas, por ejemplo, para bloquear o reducir el crecimiento del tumor o crecimiento de las células del cáncer, para bloquear o reducir el crecimiento de tumores reincidentes, etc. La invención proporciona combinaciones de inhibidores de la ANGPTL4 y agentes anti-cáncer, y los procedimientos de uso de tales combinaciones para inhibir el crecimiento tumoral. La invención también proporciona las combinaciones de inhibidores de la ANGPTL4 y los inhibidores de la angiogénesis y procedimientos de uso de tales combinaciones para inhibir el crecimiento del cáncer y/o trastornos que afectan a la angiogénesis, por ejemplo, neoplásicas (por ejemplo, el crecimiento del tumor) y desórdenes no neoplásicos.

Se proporcionan los moduladores de ANGPTL4, por ejemplo, los antagonistas de ANGPTL4 o agonistas. Antagonistas de ANGPTL4 de la invención son las moléculas que inhiben o disminuyen la actividad de ANGPTL4. Un inhibidor ANGPTL4 puede incluir una sustancia de pequeño peso molecular, un polinucleótido, moléculas antisentido, aptámeros ARN, ribozimas contra ANGPTL4 o sus polipéptidos receptores, un polipéptido, variantes antagonistas de ANGPTL4, una proteína aislada, una proteína recombinante, un anticuerpo, o conjugados o proteínas de fusión del mismo, que inhiben la actividad ANGPTL4, directa o indirectamente. En algunas realizaciones, un antagonista de ANGPTL4 incluye un anticuerpo que se une a ANGPTL4. En algunas realizaciones de la invención, un anticuerpo ANGPTL4 antagonista es un anticuerpo que inhibe o reduce la actividad de ANGPTL4 al unirse a una subsecuencia o región específica de la proteína ANGPTL4, por ejemplo, N-terminal, N-terminal de dominio super hélice, C-terminal, dominio a modo de C-terminal fibrinógeno, o ANGPTL4 (1-183), ANGPTL4 (23-183), ANGPTL4 (1 hasta aproximadamente 162), ANGPTL4 (aproximadamente 162-406), ANGPTL4 (23-406), o de ANGPTL4 (184-406) subsecuencia de aminoácidos de ANGPTL4 humanos, y/o mANGPTL4 (1-183), mANGPTL4 (23-183), mANGPTL4

(1 hasta aproximadamente 165), mANGPTL4 (23 hasta aproximadamente 165), mANGPTL4 (23-410) o mANGPTL4 (184-410) subsecuencia de aminoácidos de la murino ANGPTL4. Otras subsecuencias también incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, 40-183, 60-183, 90-183, 100-183, 120-183, 140-183, 40-406, 60-406, 80-406, 100-406, 120-406, 140-406 y 160-406 de hANGPTL4 y, por ejemplo, 40-183, 60-183, 80-183, 100-183, 120-183, 140-183, 40-410, 60-410, 80-410, 100-410, 120-410, 140-410 y 160-410 de mANGPTL4. En algunas realizaciones de la invención, un antagonista de ANGPTL4 incluye un anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_5$, por ejemplo, un antagonista del anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_5$. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención son anticuerpos humanizados. En algunas realizaciones de la invención, un antagonista de ANGPTL4 es una molécula de SiRNA. En una realización, la molécula de SiRNA es una molécula de ANGPTL4-SiRNA, donde la molécula tiene como objetivo una secuencia de ADN (por ejemplo, GTGGCCAAGCCTGCCGAAGA, SEQ ID N° 3) de un ácido nucleico que codifica ANGPTL4.

Se proporcionan procedimientos para bloquear o reducir el crecimiento del tumor o el crecimiento de una célula cancerosa. En algunas realizaciones, los procedimientos incluyen la administración al tumor o células de cáncer de una cantidad efectiva de un antagonista de tipo angiopoyetina 4 (ANGPTL4). En otra realización, el antagonista de los ANGPTL4 es un antagonista del anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_5$. La cantidad efectiva bloquea o reduce el crecimiento del tumor o el crecimiento de la célula cancerosa. También se proporcionan procedimientos para la inhibición de la migración de células tumorales. Por ejemplo, un procedimiento incluye la administración de una cantidad efectiva de un antagonista ANGPTL4 a las células tumorales, inhibiendo así su migración. En una realización de la invención, la administración del antagonista ANGPTL4 inhibe la metástasis.

Agentes terapéuticos adicionales, *por ejemplo*, uno o más agentes anti-cáncer, múltiples anticuerpos al mismo o a diferentes antígenos, uno o más agentes anti-angiogénicos o inhibidores, analgésicos, etc., se pueden combinar y/o administrarse con un antagonista ANGPTL4. Otros procedimientos terapéuticos, por ejemplo, procedimientos quirúrgicos, irradiación, etc., también pueden realizarse o administrarse al tumor y/o a las células de cáncer en los procedimientos o con las composiciones de la invención. La invención también proporciona composiciones de combinación, por ejemplo, una composición que incluye un agente anti-cáncer (por ejemplo, agente anti-angiogénesis, etc.), un antagonista de ANGPTL4, y un portador (por ejemplo, un portador farmacéuticamente aceptable).

Un agente anti-cáncer, incluye pero no está limitado a, por ejemplo, agentes anticancerígenos conocidos en la técnica y aquellos aquí descritos. En algunas realizaciones, un agente anti-cáncer comprende uno o más agente anti-angiogénesis, por ejemplo, un antagonista o un inhibidor de VEGF, etc. En una realización, un antagonista de VEGF comprende un anticuerpo anti-VEGF o un fragmento activo del mismo (por ejemplo, A4.6.1 humanizado, Avastin®, etc.). En algunas realizaciones, un agente anti-cáncer comprende uno o más agentes quimioterapéuticos.

Se proporcionan procedimientos de combinación de bloquear o reducir el crecimiento del tumor o crecimiento de una célula cancerosa. En algunas realizaciones, los procedimientos incluyen la administración al tumor o a las células cancerosas una cantidad efectiva de un agente anti-cáncer, y la administración al tumor o a las células cancerosas de una cantidad efectiva de un antagonista de ANGPTL4. Como alternativa, o además, puede ser administrada una composición que comprende una combinación de cantidad efectiva de agente anti-cáncer (por ejemplo, agente anti-angiogénesis, etc.) y una cantidad efectiva de un antagonista de ANGPTL4. Las cantidades efectivas combinadas bloquean o reducen el crecimiento del tumor o el crecimiento de las células cancerosas.

También se proporcionan procedimientos para bloquear o reducir el crecimiento de recaída del tumor o una recaída del crecimiento de las células cancerosas. En algunas realizaciones de la invención, el sujeto era, o es al mismo tiempo sometido a la terapia del cáncer con al menos un agente anti-cáncer, y se administra al sujeto una cantidad efectiva de un antagonista de ANGPTL4. La administración de la cantidad efectiva de antagonista ANGPTL4 bloquea o reduce la recidiva del crecimiento del tumor o recidiva de crecimiento de la célula del cáncer. En algunas realizaciones, el sujeto era, o es sometido al mismo tiempo a tratamiento con un antagonista ANGPTL4, y se administra al sujeto una cantidad efectiva de un agente anti-cáncer (por ejemplo, un agente anti-angiogénesis), donde la administración de la cantidad efectiva de agente anti-cáncer bloquea o reduce la recidiva el crecimiento del tumor o recaída de crecimiento celular del cáncer.

Normalmente, el tumor o las células cancerosas están en un sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto fue, es al mismo tiempo o será sometido a terapia contra el cáncer con al menos un agente anti-cáncer. Normalmente, el sujeto es un mamífero (por ejemplo, un ser humano). En algunas realizaciones, los agentes de la invención se administran a un sujeto. La administración o etapas del procedimiento se pueden realizar en cualquier orden. En una realización, se realizan de forma secuencial. En otra realización, se realizan simultáneamente. Como alternativa, o además, las etapas se pueden realizar como una combinación de ambas formas, secuencial y simultánea, en cualquier orden.

También se proporcionan equipos de moduladores ANGPTL4. En algunas realizaciones, un equipo incluye un antagonista de ANGPTL4, un portador farmacéuticamente aceptable, un vehículo o diluyente, y un contenedor. En una realización, un equipo incluye una primera cantidad de un agente anti-cáncer (por ejemplo, un agente anti-angiogénesis, etc.), una segunda cantidad de un antagonista de ANGPTL4 y un portador farmacéuticamente aceptable, un vehículo o diluyente, y un contenedor. En otra realización, un equipo incluye una cantidad de un agente anti-cáncer (por ejemplo, un agente anti-angiogénesis, etc.) y un portador farmacéuticamente aceptable, un vehículo o diluyente en forma de una primera unidad de dosificación, una cantidad de un antagonista de ANGPTL4 y un portador, un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable en forma de una segunda unidad de dosificación, y un contenedor. También pueden ser incluidas instrucciones para su uso.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra una secuencia de ácido nucleico de ANGPTL4 humana (SEQ ID NO. 1).

La Figura 2 ilustra una secuencia de aminoácidos de ANGPTL4 humana (SEQ ID NO. 2).

La Figura 3, Panel A ilustra murina recombinante purificada ANGPTL4 (23-410) separada por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE) (4-20%) en presencia (10 mM) o ausencia de ditiotreitol (TDT). Figura 3, Panel B, ilustra el tipo salvaje (carril 1) y la variante hANGPTL4 (carril 2) separados en un gel de SDS y detectados por Western Blot, donde la variante hANGPTL4 tiene una sustitución R162G y R164E.

La Figura 4, Paneles A, B, y C ilustran esquemáticamente que ANGPTL4 estimula las células tumorales A673 (Panel A y B) y proliferación de células tumorales U87MG (Panel B) mediante la transducción de células tumorales con una construcción de expresión ANGPTL4, y mediante medios acondicionados a partir de células COS (C) transducidas con una construcción de expresión ANGPTL4 (2) (Panel C). En el Panel B, las células tumorales son transducidas tanto con (1) que es control de la construcción de la expresión AdLacZ, (2) que es la construcción de la Ad-expresión ANGPTL4 o (3) que es la construcción Ad-SiRNA ANGPTL4 en el Panel C, la proliferación de células tumorales A673 se realiza con medio acondicionado a partir de HEPA (A), HMVEC (B) o células COS (C) transducidas con: (1) una construcción de expresión LacZ, (2) una construcción de expresión ANGPTL4 o (3) una construcción de expresión ANGPTL3.

La Figura 5 ilustra esquemáticamente que mANGPTL4 estimula la proliferación A673 cuando están cubiertas en placas de cultivo.

La Figura 6, Paneles A y B ilustran esquemáticamente diversas formas (Panel A) de ANGPTL4 que se unen a las células tumorales A673 y bajo diversas condiciones (Panel B).

La Figura 7, Paneles A y B ilustran esquemáticamente la proliferación de A673 con medios que contienen ANGPTL4 cuando se cultivan durante 7 días (Panel A) o 4 días (Panel B). En el Panel A, (1) es un control de construcción de expresión AdLacZ, (2) es una construcción de expresión Ad-hANGPTL4, y, (3) es una construcción de expresión AdLacZ y rmANGPTL4. En el Panel B, (1) no se añade nada, (2) es un control tampón, (3) mANGPTL4 (2,5 μ g/ml), (4) es hANGPTL4 (2,5 μ g/ml), (5) es Higg-hANGPTL4 (2,5 μ g/ml) y (6) Higg-mANGPTL4 (2,5 μ g/ml).

La Figura 8, los Paneles A, B y C ilustran esquemáticamente que ANGPTL4 promueve el crecimiento tumoral *in vivo* (Panel A y Panel B) y la tendencia a escapar de un tratamiento anti-tumoral, por ejemplo, con un anticuerpo anti-VEGF (Avastin® (Genentech, South San Francisco)), en los tumores con administración intratumoral de construcciones adenovirus-Angptl4 (Panel C). Los paneles A y C ilustran el tamaño del tumor en cm³ respecto a días posteriores a la implantación del tumor. El Panel B ilustra el peso del tumor A673 del xenoinjerto 20 días después de la implantación.

La Figura 9 ilustra como ANGPTL4 induce la migración celular de las células tumorales, A673 y 4T-1, donde a (1) no se añade suero, (2) es de 10% de suero fetal bovino (FCS), (3) es PDGF-BB, y (4) ANGPTL4.

La Figura 10, los paneles A y B ilustran que los anticuerpos anti-hANGPTL4 inhiben el crecimiento de células tumorales, por ejemplo, Panel A (HeLa-S3 y células Caki) y Panel B (células U87MG, 293 y A693), donde (1) son anticuerpos anti-hANGPTL4, (2) es un control de anticuerpos de proteínas de la región crítica 1 contra el Síndrome de Down (ICSD), y (3) no se añade nada, donde las cifras por debajo de la gráfica de barra indica la concentración de anticuerpos en (μ g/ml).

La Figura 11 ilustra la adhesión de células 293-1953 ($\alpha_v\beta_5$) a un plato cubierto tanto con ANGPTL4 o vitronectina en la concentración indicada en la parte inferior en (μ g/ml), donde la BSA se utiliza como control.

La Figura 12 demuestra que los anticuerpos anti- $\alpha_v\beta_5$ y anti-hANGPTL4 suprimen la actividad de adhesión de la célula ANGPTL4, donde (1) es BSA, (2) es vitronectina, y (3) es ANGPTL4.

La Figura 13, Los paneles A, B y C ilustran la unión de ANGPTL4 a la integrina $\alpha_v\beta_5$. Panel A ilustra la unión de la proteína (mANGPTL4, hANGPTL4-N_{terminal}, o hANGPTL4-C_{terminal}) utilizando la cantidad indicada a placas cubiertas de $\alpha_v\beta_5$. Panel B ilustra la inhibición de la unión de la proteína (mANGPTL4, hANGPTL4-N_{terminal}, o hANGPTL4-C_{terminal}) a placas cubiertas de $\alpha_v\beta_5$ con anticuerpos anti-hANGPTL4. Panel C ilustra la unión de ANGPTL4 y $\alpha_v\beta_5$, donde (1) es hANGPTL4-C_{terminal} recubiertos sobre la placa, (2) es hANGPTL4-C_{terminal} recubiertos sobre la placa e incubado con anti-hANGPTL4, (3) es hANGPTL4-C_{terminal} recubiertos en la placa y incubados anti-Dscr, (4) es Vitronectina recubierta sobre la placa y (5) es BSA recubierto en el plato, antes de añadir $\alpha_v\beta_5$.

Descripción detallada

Definiciones

5 Antes de describir la invención en detalle, debe entenderse que esta invención no se limita a composiciones particulares o a sistemas biológicos, que pueden, por supuesto, variar. También es necesario comprender que la terminología utilizada en este documento tiene el propósito de describir solamente realizaciones particulares, y no está destinada a ser limitante. Tal como se utilizan en esta especificación y las reivindicaciones anexas, la forma singular “un”, “una” y “la/el” incluyen los plurales referentes a menos que el contenido indique claramente otra cosa. Así, por ejemplo, la referencia a “una molécula” incluye opcionalmente una combinación de dos o más de tales moléculas, y similares. A menos que se defina de otra manera, todos los términos científicos y técnicos se entienden que tienen el mismo significado que se usa comúnmente en la técnica a la que pertenecen. A los efectos de la invención, los siguientes términos se definen a continuación.

15 El término “ANGPTL4” o “Angptl4” se refiere al polipéptido o proteína angiopoyetina de tipo 4, junto con las formas alélicas naturalmente producidas, segregadas, y procesadas del mismo. Por ejemplo, ANGPTL4 de humanos es una proteína de 406 aminoácidos, mientras que el ANGPTL4 de ratón es una proteína de 410 aminoácidos. El término “ANGPTL4” también se utiliza para referirse a los fragmentos (por ejemplo, subsecuencias, formas truncadas, etc.), del polipéptido que comprende, por ejemplo, fragmento N-terminal, dominio super hélice, fragmento C-terminal, dominio de tipo fibrinógeno, aminoácidos 1-183, 23-183, de 1 hasta aproximadamente 162, 23 hasta aproximadamente 162, 23-406, hasta aproximadamente 162-406 o 23-184 de la proteína 4 de tipo angiopoyetina humana, y los aminoácidos 1-183, 23-183, 1 hasta aproximadamente 165, 23 hasta aproximadamente 165, 23-410, 184-410, o de la proteína de tipo angiopoyetina 4 murino. Otros fragmentos incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, 40-183, 60-183, 80-183, 100-183, 120-183, 140-183, 40-406, 60-406, 80-406, 100-406, 120-406, 140-406 y 160-406 de la HANGPTL4 y, por ejemplo, 40-183, 60-183, 80-183, 100-183, 120-183, 140-183, 40-410, 60-410, 80-410, 100-410, 120-410, 140-410 y 160-410 de mANGPTL4. La referencia a cualquiera estas formas de ANGPTL4 también puede ser identificada en la solicitud, por ejemplo, por “ANGPTL4 (23-406)”, “ANGPTL4 (184-406)”, “ANGPTL4 (23-183)”, “mANGPTL4 (23-410)”, “mANGPTL4 (184-410)”, etc., donde m indica la secuencia murina. La posición de los aminoácidos para un fragmento ANGPTL4 nativo está numerada como se indica en la secuencia ANGPTL4 nativa. Por ejemplo, el aminoácido 22(Ser) en un fragmento ANGPTL4 es también la posición 22(Ser) en ANGPTL4 humanos nativos, por ejemplo, véase la Figura 2. En general, el fragmento ANGPTL4 nativo tiene actividad biológica.

El término “modulador ANGPTL4” se refiere a una molécula que puede activar, por ejemplo, un agonista, ANGPTL4 o su expresión, o que puede inhibir, por ejemplo, un antagonista (o inhibidor), la actividad de ANGPTL4 o su expresión. Agonistas ANGPTL4 incluyen anticuerpos y fragmentos activos. Un antagonista de ANGPTL4 se refiere a una molécula capaz de neutralizar, bloquear, inhibir, abrogar, reducir o interferir con las actividades ANGPTL4, por ejemplo, la proliferación celular o el crecimiento, migración, adhesión o metabólicos, por ejemplo, lípidos, modulación, o su expresión, incluida su unión a un receptor ANGPTL4, por ejemplo, $\alpha_v\beta_5$. Antagonistas ANGPTL4 incluyen, por ejemplo, anticuerpos anti-ANGPTL4 y fragmentos del antígeno de unión de los mismos, moléculas receptoras y sus derivados que se unen específicamente a ANGPTL4 secuestrando así su unión a uno o más receptores, anticuerpos anti-receptor de ANGPTL4 y antagonistas de los receptores ANGPTL4 tales como los inhibidores de molécula pequeña del receptor. Otros antagonistas de ANGPTL4 también incluyen variantes antagonistas de ANGPTL4, moléculas antisentido (por ejemplo, ANGPTL4-SiR-NA), aptámeros ARN, y ribozimas contra ANGPTL4 o su receptor. En algunas realizaciones, los anticuerpos ANGPTL4 antagonistas son anticuerpos que inhiben o disminuyen la actividad de ANGPTL4 al unirse a una subsecuencia o región específica de ANGPTL4, por ejemplo, fragmento N-terminal, dominio coiled-coil, fragmento C-terminal, dominio de tipo fibrinógeno, aminoácidos 1-183, 23-183, de 1 hasta aproximadamente 162, 23 hasta aproximadamente 162, 23-406, 184-406, o 23-184 de proteína de tipo 4 angiopoyetina humana y aminoácidos 1-183, 23-183, de 1 hasta aproximadamente 165, 23 hasta aproximadamente 165, 23-410, 184-410, o de proteína de tipo 4 angiopoyetina murino. Otros fragmentos incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, 40-183, 60-183, 80-183, 100-183, 120-183, 140-183, 40-406, 60-406, 80-406, 100-406, 120-406, 140-406, y 160-406 de hANGPTL4 y, por ejemplo, 40-183, 60-183, 80-183, 100-183, 120-183, 140-183, 40-410, 60-410, 80-410, 100-410, 120-410, 140-410 y 160-410 de mANGPTL4.

El término “anticuerpo anti-ANGPTL4” es un anticuerpo que se une a ANGPTL4 con una afinidad y especificidad suficientes. El anticuerpo anti-ANGPTL4 de la invención puede ser utilizado como agente terapéutico en la selección e interferencia con enfermedades o condiciones en el que está involucrada la actividad ANGPTL4. En general, un anticuerpo anti-ANGPTL4 que usualmente no se une a los otros homólogos ANGPTL4, por ejemplo, ANGPTL3.

Los términos “VEGF” y “VEGF-A” se utilizan indistintamente para referirse al factor de crecimiento endotelial vascular de 165-aminoácidos y factores de crecimiento celular de las células endoteliales vasculares relacionadas con 121-, 145-, 183-, 189- y 206- aminoácidos, como lo describe Leung *et al.* Science, 246:1306 (1989), Houck *et al.* Mol. Endocrin., 5:1806 (1991), y, Robinson & Stringer, Journal of Cell Science, 144 (5):853-865 (2001), junto con las formas naturalmente producidas alélicas y procesadas de la misma. El término “VEGF” también se utiliza para referirse a fragmentos de los polipéptidos, por ejemplo, comprendiendo aminoácidos 8 a 109 o 1 a 109 del factor de crecimiento endotelial vascular humano de 165-aminoácido. Referencia a cualquiera de estas formas de VEGF puede ser identificada en la presente solicitud, por ejemplo, por “VEGF (8-109)”, “VEGF (1-109)” o “VEGF165”. Las posiciones de los aminoácidos de un “fragmento” nativo de VEGF están numeradas como se indica en la secuencia de VEGF nativos. Por ejemplo, la posición del aminoácido 17 (metionina) en un fragmento VEGF nativo es también la

posición 17 (metionina) en el VEGF nativo. El fragmento nativo de VEGF puede tener afinidad de unión por los KDR y/o receptores Flt-1 similares al VEGF nativo.

Un “anticuerpo anti-VEGF” es un anticuerpo que se une al VEGF con una afinidad y especificidad suficientes. El anticuerpo anti-VEGF de la invención puede ser utilizado como agente terapéutico en la selección e interferencia de enfermedades o condiciones en las que está involucrada la actividad del VEGF. Un anticuerpo anti-VEGF usualmente no se unirá a otros homólogos VEGF como el VEGF-B o VEGF-C, ni otros factores de crecimiento como PlGF, PDGF o bFGF. Véase, por ejemplo, Patentes U. S. 6.582.959, 6.703.020; WO98/45332; WO 96/30046; WO94/10202; EP 0666868B1; solicitudes de patente EE.UU. 20030206899, 20030190317, 20030203409, y 20050112126; Popkov *et al.*, Journal of Immunological Methods 288:149-164 (2004), y Attorney Docket número P2072R1. El anticuerpo anti-VEGF “Bevacizumab (BV)”, también conocido como “rhUMAb VEGF” o “Avastin™”, es un anticuerpo monoclonal anti-VEGF humanizado recombinante generado de acuerdo con Presta *et al.* Cancer Res. 57:4593-4599 (1997). Comprende regiones de estructura IgG1 humanas mutadas y regiones determinantes de la complementariedad de unión del antígeno a partir de la murino anticuerpo monoclonal anti-hVEGF A.4.6.1 que bloquea la unión del VEGF humano a sus receptores. Aproximadamente el 93% de la secuencia de aminoácidos de Bevacizumab, incluyendo la mayoría de las regiones de estructura, se deriva de la IgG1 humana, y aproximadamente el 7% de la secuencia se deriva del anticuerpo murino A4.6.1. Bevacizumab tiene una masa molecular de aproximadamente 149.000 daltons y está glicosilada. Bevacizumab y otros anticuerpos anti-VEGF humanizados se describen más detalladamente en U. S. Pat. N° 6884879 expedida 26 de febrero 2005.

Un “antagonista VEGF” se refiere a una molécula capaz de neutralizar, bloquear, inhibir, abrogar, reducir o interferir con las actividades de VEGF incluyendo su unión a uno o más receptores de VEGF. Los antagonistas del VEGF incluyen anticuerpos anti-VEGF y fragmentos de antígeno de unión de los mismos, las moléculas receptoras y derivados que se unen específicamente al VEGF impidiendo así su unión a uno o más receptores, anticuerpos receptores anti-VEGF y antagonistas de los receptores de VEGF, como los inhibidores de moléculas pequeñas de las quinasas tirosina VEGFR, y proteínas de fusión, por ejemplo, VEGF-Trap (Regeneron), VEGF₁₂₁-gelonina (Peregine). Los antagonistas del VEGF también incluyen variantes antagonistas de VEGF, moléculas antisentido dirigidas al VEGF, aptámeros ARN, y ribozimas contra VEGF o receptores de VEGF.

Un polipéptido de “secuencia nativa” comprende un polipéptido con la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido derivado de la naturaleza. Por lo tanto, un polipéptido de secuencia nativa puede tener la secuencia de aminoácidos de polipéptido naturalmente producido a partir de cualquier mamífero. Dicho polipéptido de secuencia nativa puede ser aislado de la naturaleza o se puede producir por medios recombinantes o sintéticos. El término polipéptido de “secuencia nativa” específicamente abarca formas naturalmente truncadas o secretadas del polipéptido (por ejemplo, una secuencia de dominio extracelular), variantes naturalmente producidas (por ejemplo, formas empalmadas alternativamente) y variantes alélicas del polipéptido naturalmente producidas.

Una “cadena de polipéptidos” es un polipéptido en el que cada uno de los dominios del mismo se une al dominio de otro(s) por el enlace peptídico(s), a diferencia de interacciones no covalentes o enlaces disulfuro.

Un polipéptido “variante” es un polipéptido biológicamente activo que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia de aminoácido con el correspondiente polipéptido de secuencia nativa. Estas variantes incluyen, por ejemplo, polipéptidos en los que uno o más residuos de aminoácidos (aminoácido naturalmente producido y/o un aminoácido no naturalmente producido) se agregan o se eliminan, en el N- y/o C-terminal del polipéptido. Por lo general, una variante tendrá al menos un 80% identidad de secuencia de aminoácidos, o al menos un 90% identidad de secuencia de aminoácidos, o al menos el 95% o más de identidad de la secuencia de aminoácidos con el polipéptido de secuencia nativa. Las variantes también incluyen fragmentos de polipéptidos (por ejemplo, subsecuencias, truncadas, etc.), normalmente biológicamente activos, de la secuencia nativa.

“Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos” se define aquí como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que sea idéntica a los residuos de aminoácidos en una secuencia seleccionada, después de alinear las secuencias y de introducir intervalos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y no tener en cuenta algunas sustituciones conservadoras como parte de la identidad de secuencia. La alineación para los efectos de determinar el porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos puede lograrse de varias maneras que están dentro de la habilidad en la técnica, por ejemplo, utilizando los programas informáticos de software a disposición del público como BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia puede determinar los parámetros adecuados para medir la alineación, incluidos los algoritmos necesarios para lograr la alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. A efectos de este documento, sin embargo, valores de % de identidad de secuencia de aminoácido se obtienen como se describe a continuación utilizando el programa de ordenador de comparación de secuencia ALIGN-2. El Programa de ordenador de Comparación de Secuencia ALIGN-2 del fue escrito por Genentech, Inc. ha sido presentada con la documentación de usuario en la Oficina de Copyright de EE.UU., Washington DC, 20559, donde se registró bajo U.S. Copyright Registration No. TXU510087, y está a disposición del público a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California. El programa ALIGN-2 debe ser compilado para uso en un sistema operativo UNIX, por ejemplo, Digital UNIX V4.0D. Todos los parámetros de comparación de secuencias son fijados por el programa ALIGN-2 y no varían.

Para los propósitos aquí, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos determinada A respecto a, con, o contra de una determinada secuencia de aminoácidos B (que, alternativamente, se puede

expresar como una secuencia de aminoácidos dada que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácido respecto a, con, o contra de una determinada secuencia de aminoácidos B) se calcula como sigue:

100 veces la fracción X/Y

donde X es el número de residuos de aminoácidos calificados como exactamente iguales por el programa de alineamiento de secuencias ALIGN-2 en la alineación de ese programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se puede apreciar que, cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de la secuencia de aminoácido de A respecto a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácido de B a A.

El término “variante ANGPTL4” como se usa aquí se refiere a una variante como se describió anteriormente y/o un ANGPTL4 que incluye una o más mutaciones de los aminoácidos en la secuencia de ANGPTL4 nativo. Opcionalmente, la una o más mutaciones de aminoácidos incluyen sustitución(es) del aminoácido. ANGPTL4 y sus variantes, para su uso en la invención pueden ser preparados por una variedad de procedimientos bien conocidos en la técnica. Variantes de la secuencia de aminoácidos de ANGPTL4 pueden ser preparadas por mutaciones en el ADN del ANGPTL4. Estas variantes incluyen, por ejemplo, supresiones, inserciones o sustituciones de los residuos dentro de la secuencia de aminoácidos de ANGPTL4, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos humana codificada por el ácido nucleico depositado bajo el número de depósito ATCC 209284, o como se muestra en la Figura 2. Cualquier combinación de delección, inserción, y sustitución puede hacerse para llegar a la construcción final con la actividad deseada. Las mutaciones que se realizarán en el ADN que codifica la variante no deben colocar la secuencia fuera del marco de lectura y de preferencia no crearán regiones complementarias que podrían producir la estructura secundaria del mRNA. EP 75444 A.

Las variantes ANGPTL4 opcionalmente son preparadas por mutagénesis dirigida a los sitios de los nucleótidos en el ADN que codifica la ANGPTL4 nativa o de las técnicas de visualización de fagos, produciendo así el ADN que codifica la variante y, posteriormente, expresar el ADN en un cultivo celular recombinante.

Aunque el sitio para introducir una variación de la secuencia aminoácido está predeterminado, la mutación en sí no necesita ser determinada. Por ejemplo, para optimizar el rendimiento de una mutación en un sitio determinado, puede llevarse a cabo mutagénesis aleatoria en el codón de destino o región y las variantes ANGPTL4 expresadas para detectar la combinación óptima de la actividad deseada. Técnicas para realizar mutaciones de sustitución en lugares predeterminados en el ADN que tienen una secuencia conocida son bien conocidas, tales como, por ejemplo, mutagénesis específica del sitio. La preparación de las variantes ANGPTL4 aquí descritas se pueden conseguir mediante técnicas de fagos, tales como los descritos en las Publicación PCT WO 00/63380.

Después de seleccionar dicho clon, la región de la proteína mutada puede ser extraída y colocada en un vector apropiado para la producción de proteínas, en general, un vector de expresión del tipo que puede ser empleado para la transformación de un huésped adecuado.

Las supresiones de secuencia de aminoácidos generalmente oscilan desde aproximadamente 1 a 30 residuos, opcionalmente de 1 a 10 residuos, opcionalmente de 1 a 5 residuos o menos, y normalmente son contiguas.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones de amino- y/o carboxilo-terminal a partir de un residuo a polipéptidos de longitud esencialmente ilimitada, así como inserciones intrasecuencia de uno o múltiples aminoácidos. Inserciones intrasecuencia (es decir, las inserciones dentro de la secuencia ANGPTL4 nativa) pueden oscilar desde aproximadamente 1 a 10 residuos, opcionalmente, de 1 a 5, o, opcionalmente, de 1 a 3. Un ejemplo de una inserción de terminal incluye una fusión de una secuencia señal, ya sea homóloga o heteróloga de la célula huésped, al N-terminal para facilitar la secreción a partir de huéspedes recombinantes.

Variantes adicionales de ANGPTL4 son aquellas en las que al menos un residuo de aminoácido en la ANGPTL4 nativa ha sido retirado y se inserta un residuo diferente en su lugar. En una realización de la invención, la variante ANGPTL4 incluye una sustitución en 162 y/o 164 de ANGPTL4 o una sustitución en 169 de mANGPTL4. Dichas sustituciones podrán realizarse de conformidad con las que se muestran en la Tabla 1. Variantes ANGPTL4 pueden ser también aminoácidos no naturales, como aquí se describen.

Los aminoácidos pueden ser agrupados de acuerdo a similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en A. L. Lehninger, en Biochemistry, segunda ed., pp. 73-75, Worth Publishers, Nueva York (1975)):

- (1) no polar: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)
- (2) sin carga polar: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q),
- (3) ácido: Asp (D), Glu (E),
- (4) básico: Lys (K), Arg (R), Su (H)

ES 2 339 789 T3

Alternativamente, los residuos naturalmente producidos pueden dividirse en grupos basados en propiedades comunes de las cadenas laterales:

- (1) hidrofóbico: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrofílico neutral: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácido: Asp, Glu;
- (4) básico: His, Lys, Arg;
- (5) residuos que influyen la orientación de la cadena: Gly, Pro;
- (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

TABLA 1

Residuo Original	Sustituciones de Ejemplo	Sustituciones preferidas
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, Ser, Asp, Lys, Arg	Gln
Asp (D)	Glu, Asn	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn, Glu	Asn
Glu (E)	Asp, Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
Ser (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Trp, Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val, Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, Norleucina	Leu

“Residuos de aminoácidos naturalmente producidos” (es decir, residuos de aminoácidos codificados por el código genético) pueden ser seleccionados entre el grupo formado por: Alanina (Ala); arginina (Arg); asparagina (ASN); ácido aspártico (Asp); cisteína (Cys); glutamina (Gln); ácido glutámico (Glu); glicina (Gly); histidina (His); isoleucina (Ile); leucina (Leu); lisina (Lys); metionina (Met); fenilalanina (Phe); prolina; (Pro); serina (Ser); treonina (Thr); triptófano (Trp); tirosina (Tyr) y valina (Val). Un “residuo de aminoácidos no naturalmente producido” se refiere a un residuo, distinto de los aminoácidos naturalmente producidos mencionados, que es capaz de unir covalentemente residuos de aminoácidos adyacentes en una cadena de polipéptidos. Ejemplos de residuos de aminoácidos no-naturalmente producidos incluyen, por ejemplo, norleucina, ornitina, norvaline, homoserina y otros análogos de residuos de aminoácidos, tales como los descritos en Ellman *et al.* Meth. Enzym. 202:301-336 (1991) & publicaciones de solicitudes de patente EE.UU. 20030108885 y 20030082575. En resumen, estos procedimientos incluyen la activación de un supresor de ARNt con un residuo de aminoácidos no-naturalmente producido seguido por transcripción y traducción *in vitro* o *in vivo* del RNA. Véase, por ejemplo, publicaciones de solicitud de patente EE.UU. 20030108885 y 20030082575; Noren *et al.* Science 244:182 (1989), y, Ellman *et al.*, *supra*.

Un polipéptido “aislado” es uno que ha sido identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno natural. Componentes contaminantes de su entorno natural son los materiales que pueden interferir con los usos terapéuticos o de diagnóstico para el polipéptido, y puede incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteicos o proteicos. En algunas realizaciones, el polipéptido será purificado (1) a más del 95% en peso de polipéptido según lo determinado por el procedimiento de Lowry, o más del 99% en peso, (2) en un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de N-terminal o secuencia de aminoácidos interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (3) a la homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras con azul de Coomassie o tinción de plata. Un polipéptido aislado incluye el polipéptido *in situ* dentro de las células recombinantes ya que al menos uno de los componentes del ambiente natural del polipéptido no estará presente. Por lo general, sin embargo, un polipéptido aislado será preparado mediante al menos una etapa de purificación.

El término “anticuerpo” se utiliza en el sentido más amplio e incluye anticuerpos monoclonales (incluida la longitud total o anticuerpos monoclonales intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos polivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpos (véase más adelante) siempre y cuando exhiban la actividad biológica deseada.

Salvo que se indique lo contrario, la expresión “anticuerpo polivalente” se utiliza a lo largo de esta especificación para denotar un anticuerpo que comprende tres o más sitios de unión del antígeno. El anticuerpo polivalente es típicamente diseñado para tener tres o más sitios de unión del antígeno y generalmente no es un anticuerpo de secuencia natural de IgM o IgA.

“Fragmentos de anticuerpos” comprenden sólo una porción de un anticuerpo intacto, en general, incluyendo un sitio de unión del antígeno del anticuerpo intacto y así manteniendo intacta la capacidad de unir al antígeno. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos abarcados por la actual definición se incluyen: (i) el fragmento Fab, con dominios VL, CL, VH y CH1, (ii) el fragmento Fab', que es un fragmento Fab que tiene uno o más residuos de cisteína en el C-terminal del dominio CH1, (iii) el fragmento Fd con dominios VH y CH1, (iv) el fragmento Fd' con dominios VH y CH1 y uno o más residuos cisteína en el C-terminal del dominio CH1, (v) el fragmento Fv con los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (vi) el fragmento dAb (Ward *et al.*, Nature 341, 544-546 (1989)), que consta de un dominio VH, (vii) regiones aisladas del CDR, (viii) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente incluyendo dos fragmentos Fab' unidos por un puente disulfuro en la región bisagra, (ix) moléculas de anticuerpos de cadena única (por ejemplo, solo la cadena de FV; scFv) (Bird *et al.*, Science 242:423-426 (1988), y Huston *et al.*, PNAS (EE.UU.) 85:5879-5883 (1988)); (x) “diacuerpos” con dos sitios de unión del antígeno, que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (véase, por ejemplo, PE 404.097; WO 93/11161 y Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 90:6444-6448 (1993)); (xi) “anticuerpos lineales”, que comprenden un par de segmentos tándem de FD (VH-CH1-VH-CH1) que, junto con polipéptidos complementarios de cadena liviana, forman un par de regiones de unión del antígeno (Zapata *et al.* Protein Eng. 8(10):1057 1062 (1995), y Patente EE.UU. n° 5.641.870).

El término “anticuerpo monoclonal” como se usa aquí, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos que integran la población son idénticos, salvo de posibles mutaciones que ocurren naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigidos contra un solo antígeno. Además, a diferencia de los preparados de anticuerpos policlonales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra los diferentes factores determinantes (epitopos), cada anticuerpo monoclonal es dirigido contra un solo determinante en el antígeno. El modificador “monoclonal” no se interpretará como una exigencia de la producción de anticuerpos por cualquier procedimiento en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se utilizan de acuerdo con la invención pueden ser hechos por el procedimiento del hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, Nature 256:495 (1975), o pueden hacerse por procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Patente U. S. No. 4.816.567). Los “anticuerpos monoclonales” también pueden ser aislados de las bibliotecas de anticuerpos de fagos utilizando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, Nature 352:624-628 (1991) o Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991), por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales en este documento incluyen específicamente anticuerpos “quiméricos” en los que una parte de la cadena pesada y/o liviana es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpos en particular, mientras que

el resto de la cadena(s) sea idéntica o homóloga a las secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de otras especies o perteneciente a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, mientras que exhiban la actividad biológica deseada (Patente U. S. No. 4,816,567 y Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 81:6851-6855 (1984)).

Formas “humanizadas” de anticuerpos no-humanos (por ejemplo, murina) son anticuerpos quiméricos que contienen secuencias mínimas derivadas de inmunoglobulina no-humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son las inmunoglobulinas humanas (anticuerpos receptores) en los que los residuos de una región hipervariables del receptor se sustituyen por los residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpos de los donantes), tales como ratón, rata, conejo o primates no humanos con la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, residuos de la región marco (FR) de inmunoglobulina humana son sustituidos por los residuos no-humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo del donante. Estas modificaciones se realizan para perfeccionar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado incluirá sustancialmente todos de al menos uno, y por lo general dos, dominios variables, en el que todos o casi todos los bucles hipervariables correspondan a los de una no-inmunoglobulina humana y de todos o casi todos los FRs son los de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado, opcionalmente, también contará con al menos una porción de una región constante inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones *et al.*, Nature 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332:323-329 (1988), y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992).

Un “anticuerpo humano” es el que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o se ha realizado utilizando cualquiera de las técnicas para producir anticuerpos humanos, aquí divulgadas. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente a un anticuerpo humanizado que comprende residuos antígenos de unión no humanos. Los anticuerpos humanos pueden ser producidos a partir de diferentes técnicas conocidas en la técnica. En una realización, el anticuerpo humano se selecciona de una biblioteca de fagos, donde esa biblioteca de fagos expresa anticuerpos humanos (Vaughan *et al.* Nature Biotechnology 14:309-314 (1996); Sheets *et al.* PNAS (EE.UU.) 95:6157-6162 (1998)); Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581 (1991)). Los anticuerpos humanos también pueden hacerse mediante la introducción de loci de las inmunoglobulinas humanas en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena han sido parcial o totalmente inactivados. Ante la amenaza, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se asemeja mucho a la observada en los seres humanos en todos los aspectos, incluyendo el reordenamiento del gen, montaje, y repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las Patentes U. S. Nos. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en las publicaciones científicas siguientes: Marks *et al.*, Bio/Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368:812-13 (1994); Fishwild *et al.*, Nature Biotechnology 14: 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14: 826 (1996); Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995). Alternativamente, el anticuerpo humano puede ser preparado a través de la inmortalización de los linfocitos B humanos produciendo un anticuerpo dirigido contra un antígeno objetivo (dichos linfocitos B pueden recuperarse de un individuo o pueden haber sido inmunizados *in vitro*). Véase, por ejemplo, Cole *et al.*, Monoclonal antibodies and Cancer Therapy, Alan R Liss, p. 77 (1985); Boerner *et al.*, J. Immunol., 147 (1):86-95 (1991), y Pat. EE.UU. No. 5.750.373.

El término “variable” se refiere al hecho de que ciertas partes de los dominios variables difieren ampliamente en secuencia entre los anticuerpos y se utilizan en la unión y la especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno en particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente en todos los dominios variables de anticuerpos. Se concentra en tres segmentos llamados regiones hipervariables tanto en los dominios variables de cadena liviana y de cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se llaman las regiones de estructura (FRs). Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras nativas cada uno compuesto por cuatro FRs, adoptando en gran medida de una configuración de hoja beta, conectadas por tres regiones hipervariables, que forman enlaces de conexión, y en algunos casos formando parte de la estructura de hoja beta. Las regiones hipervariables de cada cadena se mantienen unidas en las proximidades de la FRs y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes que no están implicados directamente en la unión un anticuerpo con un antígeno, pero presentan diferentes funciones efectoras, como la participación de los anticuerpos en la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC).

El término “región hipervariable” cuando se usa aquí, se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión del antígeno. La región hipervariable generalmente incluye residuos de aminoácidos de la “región determinante de la complementariedad” o “CDR” (por ejemplo, residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de la cadena liviana y el 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o los residuos de un “lazo hipervariable” (por ejemplo, residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de la cadena liviana y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96/101 (H3) en el dominio variable la cadena pesada; Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Los residuos “región de estructura” o “FR” son los residuos de dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable aquí definidos.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos intactos pueden ser asignados a diferentes “clases”. Hay cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varios de ellos pueden ser divididos en “subclases” (isotipos), *por ejemplo*, IgG₁ (incluidos los alotipos no-A y A), IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA e IgA₂. Los dominios constantes de pesada cadena que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras de la subunidad y tres configuraciones tridimensionales de las distintas clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

Las cadenas livianas de anticuerpos de cualquiera de las especies de vertebrados pueden ser asignadas a uno de dos tipos claramente diferenciados, llamados kappa (κ) y lambda (λ), basados en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

El término “región Fc” se utiliza para definir la región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que puede ser generada por la digestión de la papaína de un anticuerpo intacto. La región Fc puede ser una región de secuencia nativa de la Fc o de una región Fc variante. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de la cadena pesada de la IgG humana es usualmente definida para estirarse desde un residuo de aminoácido aproximadamente en una posición Cys226, o aproximadamente de una posición Pro230, al carboxilo-terminal de la región Fc. La región Fc de una inmunoglobulina en general, consta de dos dominios constantes, un dominio CH2 y un dominio CH3, y, opcionalmente, dispone de un dominio CH4.

Por “cadena de región Fc” se entiende aquí una de las dos cadenas polipeptídicas de una región Fc.

El “dominio CH2” de una región Fc de la IgG humana (también conocido como “dominio CG2”) generalmente se extiende de un residuo de aminoácido aproximadamente en la posición 231 a un residuo de aminoácido aproximadamente en la posición 340. El dominio CH2 es único en que no está estrechamente emparejado con otro dominio. Más bien, dos cadenas de hidratos de carbono ramificadas N-vinculadas se interponen entre los dos dominios CH2 de la molécula IgG nativa intacta. Se ha especulado que los hidratos de carbono pueden ser un sustituto para el emparejamiento de dominio a dominio y ayudar a estabilizar el dominio CH2. Burton, Molec. Immunol. 22:161-206 (1985). El dominio CH2 aquí puede ser un dominio CH2 de secuencia nativa o dominio CH2 variante.

El “dominio CH3” comprende el tramo de los residuos de C-terminal a un dominio CH2 en una región Fc (es decir, de un residuo de aminoácido aproximadamente en la postura de 341 a un residuo de aminoácido aproximadamente en posición 447 de un IgG). La región CH3 aquí puede ser un dominio CH3 de secuencia nativa o un dominio CH3 variante (por ejemplo, un dominio CH3 con una “protuberancia” introducida en una cadena del mismo, y la correspondiente “cavidad” introducida en la otra cadena del mismo; véase Patente EE.UU. n° 5.821.333. Estos dominios CH3 variantes pueden ser usados para hacer anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos), tal como aquí se describe.

La “región bisagra” se define generalmente como el estiramiento desde aproximadamente Glu216, o aproximadamente Cys226, hasta aproximadamente Pro230 de la IgG1 humana (Burton, Molec. Immunol. 22:161-206 (1985)). Regiones de bisagra de otros isotipos IgG pueden ser alineadas con la secuencia de la IgG1 colocando el primer y el último residuo de cisteína que forman enlaces S-S entre cadenas pesadas en las mismas posiciones. La región bisagra aquí puede ser una región bisagra de secuencia nativa o una región bisagra variante. Las dos cadenas polipeptídicas de una región bisagra variante en general, mantienen al menos un residuo de cisteína por cadena de polipéptidos, de modo que las dos cadenas polipeptídicas de la región bisagra variante pueden formar un puente disulfuro entre las dos cadenas. La región bisagra preferido aquí es una región bisagra humano de secuencia nativa, por ejemplo, una región bisagra IgG1 humana de secuencia nativa.

Una “región Fc funcional” posee al menos una “función efectora” de una región Fc de secuencia nativa. “Funciones efectoras” ejemplares incluyen la unión de C1q, la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC); unión Fc receptor; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis, regulación descendente de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, de los receptores de células B; BCR), etc. Estas funciones efectoras generalmente requieren que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo) y pueden evaluarse mediante varios ensayos de conocidos en la técnica para evaluación de las funciones efectoras de dichos anticuerpos.

Una “región Fc de secuencia nativa” comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc encontrada en la naturaleza.

Una “región Fc variante” comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia nativa, en virtud de al menos una modificación de los aminoácidos. En algunas realizaciones, la región Fc de la variante tiene al menos una sustitución de un aminoácido en comparación con una región Fc de secuencia nativa o con la región Fc de un polipéptido parental, por ejemplo, aproximadamente de una a diez sustituciones de aminoácidos, y preferentemente de aproximadamente entre uno y cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido parental. La región Fc variante aquí normalmente posee, por ejemplo, al menos aproximadamente el 80% de identidad de secuencia con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido parental, o al menos aproximadamente 90% de identidad de secuencia con el mismo, o al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia o más con el mismo.

“Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos” y “ADCC” se refieren a una reacción mediada por células en las que células citotóxicas no específicas que expresan receptores Fc (FcR) (por ejemplo, células asesinas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen el anticuerpo unido en una célula objetivo y, posteriormente, provocan la lisis de la célula objetivo. Las células primarias para la ADCC mediada, células NK, sólo expresan FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión FcR en las células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la Página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, puede ser realizado un ensayo *in vitro* de ADCC, como el descrito en la Patente EE.UU. n° 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras de interés para estos análisis incluyen las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y células asesinas naturales (NK). Como alternativa, o además, la actividad ADCC de la molécula de interés puede ser evaluada *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal, como se describe en Clynes *et al.* PNAS (EE.UU.) 95:652-656 (1998).

Las “células efectoras humanas” son los leucocitos que expresan una o más FcRs y realizan funciones efectoras. Normalmente, las células expresan al menos FcγRIII y realizan funciones efectoras ADCC. Ejemplos de leucocitos humanos que median ADCC incluyen las células mononucleares de la sangre periférica (CMSP), asesinas naturales (NK), monocitos, linfocitos T citotóxicos y neutrófilos, siendo en general preferidas las células PBMCs y NK. Las células efectoras se pueden aislar de una fuente natural de las mismas, por ejemplo, de la sangre o PBMCs como se describe en este documento.

Los términos “receptores Fc” y “FcR” se utilizan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye los receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, y FcγRIII, incluyendo las variantes alélicas y formas de empalme alternativo de estos receptores. Los receptores de FcγRII incluyen FcγRIIA (una “receptor activador”) y FcγRIIB (un “receptor inhibidor”), que tienen secuencias similares de aminoácidos que difieren principalmente en los dominios del citoplasma de los mismos. El receptor activador de FcγRIIA contiene un motivo inmunoreceptor de la activación basado en la tirosina (ITAM) en su dominio citoplasmático. Un receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo inmunoreceptor de la inhibición basado en la tirosina (ITIM) en su dominio citoplasmático (revisado en Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). FcR se examinan en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991); Capel *et al.* *Immunomethods* 4:25-34 (1994), y de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med* 126:330-41 (1995). Otros FcR demás, incluidos los que se determinarán en el futuro, están comprendidos en el término “FcR” aquí. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgGs maternas al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol* 117:587 (1976), y Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)).

“Citotoxicidad dependiente de complemento” y “CDC” se refieren a la lisis de un objetivo en la presencia del complemento. La vía de activación del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) acomplejada con un antígeno afin. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de los CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996).

Un anticuerpo “madurado por afinidad” es uno con una o más alteraciones en uno o más CDRs del mismo que resulta una mejora en la afinidad de los anticuerpos para el antígeno, en comparación con un anticuerpo de origen que no posee esa alteración(es). Los anticuerpos madurados por afinidad preferidos tendrán afinidades nanomolar o incluso picomolares para el antígeno objetivo. Los anticuerpos madurados por afinidad son producidos por los procedimientos conocidos en la técnica. Marks *et al.* *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) describe la maduración por afinidad por arrastre del dominio VH y VL. Mutagénesis aleatoria de los CDR y/o residuos marco se describen en: Barbas *et al.* *Proc Nat. Acad. Sci., EE.UU.* 91:3809-3813 (1994); Schier *et al.* *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton *et al.* *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson *et al.*, *J. Immunol.* 154 (7):3310-9 (1995), y Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

Un “conector flexible” aquí se refiere a un péptido formado por dos o más residuos aminoácidos unidos por enlace peptídico(s), y proporciona una mayor libertad de rotación para dos polipéptidos (tal como dos regiones Fd) vinculadas por ellos. Tal libertad de rotación permite que dos o más sitios de unión del antígeno unidos por el enlazador flexible acceda a cada antígeno(s) objetivo de manera más eficiente. Ejemplos de secuencias peptídicas flexibles enlazadoras adecuadas incluyen gly-ser, gly-gly-ser-ser, ala-ser, y gli-gli-gli-ser.

Un “dominio de dimerización” está formado por la asociación de al menos dos residuos de aminoácidos (en general residuos de cisteína) o de al menos dos péptidos o polipéptidos (que puede tener la misma o diferentes secuencias de aminoácidos). Los péptidos o polipéptidos pueden interactuar entre sí mediante enlaces covalentes y/o asociación(es) no covalente. Ejemplos de dominios de dimerización de la presente incluyen una región Fc, una región bisagra, un dominio CH3, un dominio CH4, un par CH1-CL, una “interfaz” con un “bulbo” de ingeniería y/o “protuberancia” como se describe en la Patente EE.UU. n° 5.821.333, una cremallera de leucina (por ejemplo, una cremallera de leucina jun/fos, véase Kostelney *et al.*, *J. Immunol.*, 148: 1547-1553 (1992), o una cremallera de leucina GCN4 levadura), una cremallera de isoleucina, un par dímero receptor (por ejemplo, receptor-8 de la interleucina (IL-8R), y heterodímeros de integrinas como LFA-1 y GPIIb/IIIa), o la región(es) de dimerización de la misma; dimérica polipéptidos ligando (por ejemplo, el factor de crecimiento nervioso (NGF), neurotrofinas-3 (NT-3), interleuquina-8 (IL-8), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), VEGF-C, VEGF-D, elementos de PDGF, y factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), véase Arakawa *et al.* *J. Biol. Chem.* 269 (45): 27833-27839 (1994) y Radziejewski *et al.* *Biochem.* 32 (48): 1350 (1993)), o la región(es) de dimerización de la misma, un par de residuos de cisteína capaces de formar

un puente disulfuro, un par de péptidos o polipéptidos, comprendiendo cada uno al menos un residuo de cisteína (por ejemplo, aproximadamente uno, dos o tres hasta aproximadamente diez los residuos de cisteína), de forma tal que se puede formar un enlace(s) disulfuro entre los péptidos o polipéptidos (en lo sucesivo, “una bisagra sintética”), y dominios variables de anticuerpos. El dominio de la dimerización más preferido en este documento es una región Fc o una región de bisagra.

Un “sitio de unión del antígeno funcional” de un anticuerpo es uno que es capaz de unirse a un antígeno objetivo. La afinidad de unión del antígeno del sitio de unión del antígeno no es necesariamente tan fuerte como el anticuerpo de origen desde el que el sitio de unión del antígeno se deriva, sino que la capacidad de unir antígeno debe ser medible usando cualquiera de una variedad de procedimientos conocidos para la evaluación de la unión de anticuerpos a un antígeno. Por otra parte, la afinidad de unión del antígeno de cada uno de los sitios de unión del antígeno de un anticuerpo multivalente aquí no tiene por qué ser cuantitativamente la misma. Para los anticuerpos multiméricos aquí, el número de sitios de unión funcionales del antígeno pueden ser evaluados utilizando el análisis de ultracentrifugación. Según este procedimiento de análisis, se combinan diferentes relaciones de antígeno objetivo respecto al anticuerpo multiméricos y el peso molecular medio de los complejos se calcula suponiendo un número diferente de sitios de unión funcional. Estos valores teóricos se comparan con los valores experimentales reales obtenidos con el fin de evaluar el número de sitios de unión funcional.

Un anticuerpo que tenga una “característica biológica” de un anticuerpo designado es el que posee una o más de las características biológicas de un anticuerpo que lo distinguen de otros anticuerpos que se unen al mismo antígeno.

Con el fin de detectar los anticuerpos que se unen a un epítipo de un antígeno unido por un anticuerpo de interés, se puede realizar un ensayo de bloqueo cruzado de rutina como el descrito en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold-Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988).

Administración “en combinación con” uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (concurrente) y/o consecutiva en cualquier orden.

“Mamíferos” a los efectos del tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluidos los seres humanos, animales domésticos y de granja y zoológico, deportivos o animales de compañía, como perros, caballos, gatos, vacas, ovejas, cerdos, etc. Típicamente, el mamífero es un ser humano.

Un “trastorno” es cualquier condición que se beneficiaría de un tratamiento con las moléculas de la invención. Esto incluye enfermedades crónicas y agudas o enfermedades, incluyendo las condiciones patológicas que predisponen a los mamíferos a la enfermedad en cuestión. Ejemplos no limitativos de enfermedades a ser tratadas aquí incluyen cualquier tipo de tumor, tumores benignos y malignos; tumores vascularizados; hipertrofia; leucemias y tumores linfoides; desórdenes neuronales, gliales, astrocitales, hipotalámicos y otros glandulares, macrófagos, epiteliales, estromales y blastocóelicos; e inflamatorios, trastornos inmunológicos y angiogénicos, trastornos vasculares que resultan en la vascularización inadecuada, aberrante, excesiva y/o patológica y/o permeabilidad vascular.

El término “cantidad efectiva” o “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a una cantidad de un fármaco eficaz para tratar una enfermedad o trastorno en un mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad efectiva del fármaco puede reducir el número de células cancerosas, reducir el tamaño del tumor, inhibir (es decir, ralentizar en cierta medida y, normalmente, detener) la infiltración de células de cáncer en los órganos periféricos, inhibir (es decir, ralentizar en cierta medida y, normalmente, detener) la metástasis del tumor, inhibir, en cierta medida, el crecimiento del tumor y/o aliviar en cierta medida, uno o más de los síntomas asociados con el trastorno. En la medida en que el fármaco podría prevenir el crecimiento y/o destruir las células cancerosas ya existentes, puede ser citostáticos y/o citotóxicos. Para el tratamiento del cáncer, la eficacia *in vivo*, puede, por ejemplo, ser medida por la evaluación de la duración de la supervivencia, tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP), tasas de respuesta (RR), duración de la respuesta, y/o calidad de vida. “Tratamiento” se refiere tanto a un tratamiento terapéutico y profiláctico o a medidas preventivas. Aquellos que están en necesidad de tratamiento incluyen que ya tienen el trastorno, así como aquellos en los que el trastorno se debe prevenir.

El término “actividad biológica” y “biológicamente activo” aquí con respecto a las moléculas ANGPTL4, se refieren a la capacidad de una molécula para unirse específicamente y regular la respuesta celular, por ejemplo, proliferación, adhesión, migración, modulación de lípidos, etc. Las respuestas celulares también incluyen las mediadas a través de un receptor de ANGPTL4, por ejemplo, un receptor de la integrina $\alpha_v\beta_5$, incluyendo pero no limitando a, adhesión, migración, y/o proliferación. En este contexto, el término “modular” incluye tanto la promoción como la inhibición. Las moléculas de la invención también incluyen agonistas y antagonistas de un receptor ANGPTL4, por ejemplo, receptores de la integrina $\alpha_v\beta_5$. “Hipertrofia”, como aquí se utiliza, se define como un aumento de la masa de un órgano o estructura independiente de crecimiento natural, que no implique la formación de tumores. La hipertrofia de un órgano o tejido se deba a un aumento de la masa de las células individuales (hipertrofia verdadera), o a un aumento en el número de células que constituyen los tejidos (hiperplasia), o ambos.

Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren a o describen la condición fisiológica en los mamíferos que se caracterizan por un crecimiento irregular de células. Ejemplos de cáncer incluyen pero no están limitados a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia o neoplasias linfoides. Más ejemplos concretos de esos tipos de cáncer son el cáncer de riñón o renal, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón

incluyendo el cáncer de células pequeñas de pulmón, cáncer no microcítico de pulmón, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma epidermoide de pulmón, cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer epitelial de células escamosas), cáncer cervicouterino, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer de estómago o gástrico incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, cáncer de cabeza y cuello, glioblastoma, retinoblastoma, astrocitoma, comas, arrenoblastomas, hepatoma, neoplasias hematológicas como el linfoma no Hodgkins (LNH), mieloma múltiple y neoplasias malignas hematológicas graves, carcinoma de endometrio o uterino, endometriosis, fibrosarcomas, coriocarcinoma, carcinoma de glándula salival, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma de esófago, cáncer hepático, carcinoma de pene, carcinoma nasofaríngeo, carcinomas de laringe, sarcoma de Kaposi, melanoma, cáncer de piel, Schwannoma, oligodendroglioma, neuroblastoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma osteogénico, leiomyosarcomas, carcinomas del tracto urinario, carcinomas de tiroides, tumor de Wilm, así como linfoma de células B (incluido linfoma no Hodgkin de grado bajo/folicular (LNH); NHL linfocítica pequeña (SL); LNH de grado intermedio/folicular; LNH difuso de grado intermedio; LNH de alto grado inmunoblástico; NHL linfoblástico de alto grado; NHL de células pequeñas no hendidas de alto grado, NHL enfermedad voluminosa, linfoma de células del manto, linfoma relacionado con el SIDA; y macroglobulinemia de Waldenstrom), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia de células pilosas, leucemia mieloblástica crónica; y trastorno linfoproliferativo post-trasplante (PTLD), así como la proliferación vascular anormal asociada con facomatosis, edema (como el asociado con tumores cerebrales), y el síndrome de Meigs.

El término “composición anti-neoplásica” se refiere a una composición útil en el tratamiento del cáncer que comprende al menos un agente terapéutico activo, por ejemplo, “agente anti-cáncer”. Ejemplos de agentes terapéuticos (agentes anti-cáncer) incluyen, pero están limitados a, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores de crecimiento, agentes citotóxicos, los agentes utilizados en la terapia de radiación, agentes anti-angiogénesis, agentes de apoptosis, agentes anti-tubulina, toxinas, y otros agentes para tratar el cáncer, por ejemplo, anticuerpos neutralizantes anti-VEGF, antagonista del VEGF, anti-HER-2, anti-CD20, un antagonista del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), un (por ejemplo, un inhibidor de la tirosina quinasa), inhibidor HER1/EGFR, erlotinib, un inhibidor COX-2 (por ejemplo, celecoxib), interferones, citoquinas, antagonistas (por ejemplo, los anticuerpos neutralizantes) que se unen a una o más de los ErbB2, ErbB3, ErbB4, o receptor(es) de VEGF, inhibidores de los receptores tirosina quinasa para factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y/o factor de células troncales (SCF) (por ejemplo, el mesilato de imatinib (Gleevec® de Novartis)), TRAIL/Apo2 y otros agentes químicos y orgánicos bioactivos, etc. También se incluyen combinaciones de los mismos en la invención.

El término “agente citotóxico” como se usa aquí se refiere a una sustancia que inhibe o impide el funcionamiento de las células y/o causa la destrucción de las células. El término pretende incluir los isótopos radiactivos (por ejemplo, ²¹¹At, ¹³¹I, ¹²⁵I, ⁹⁰Y, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁵³Sm, ²¹²Bi, ³²P e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, y toxinas, tales como las toxinas de molécula pequeña o toxinas activas por vía enzimática de bacterias, plantas de hongos, o de origen animal, incluidos fragmentos y/o variantes de las mismas.

Un “agente inhibidor del crecimiento” cuando se usa aquí, se refiere a un compuesto o una composición que inhibe el crecimiento de una célula *in vitro* y/o *in vivo*. Así, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduce significativamente el porcentaje de células en fase S. Ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento son los agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar distinto de la fase S), como los agentes que inducen la detención G1 y la detención de M-fase. Bloqueantes clásicos de M-fase incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), Taxol®, y los inhibidores tipo II, como la doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Los agentes de detención G1 también se extienden en la detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes del ADN como el tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Más información puede encontrarse en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, titulado “Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs” por Murakami *et al.* (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente p. 13.

Un “agente de quimioterapia” es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Ejemplos de agentes quimioterápicos son los agentes alquilantes como la tiotepa y Cytoxan® ciclofosfamida, sulfonatos de alquilo, como busulfano, improsulfan y piposulfan; aziridinas como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenomelamina, trietilenefosforamida, trietilenetiofosforamida y trimetilomelamina; acetogeninas (especialmente bullatacin y bullatacinona), delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®; beta-lapachone; lapachol; colchicina, ácido betulínico, una camptotecina (incluido el análogo sintético de topotecan (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecin, scoplectin, y 9-aminocamptotecin); Bryostatina; calystatin, CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesin, carzelesin y bizelesin); podofilotoxina, ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (en particular, criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluidos los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobin; pancratistatin, un sarcodictyin; spongistatin; mostazas nitrogenadas, tales como el clorambucil, mecloretamina clomafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembichin, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas como carmustina, clorozotocin, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos como los antibióticos enedinyne (por ejemplo, caliqueamicina, gammall especialmente caliqueamicina y caliqueamicina omega11 (véase, por ejemplo, Agnew, Chem. INTL. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); dinemicina, incluyendo dinemicina A, una esperamicina, así como cromóforo neocarzinostatin y cromóforos cromoproteína enedinyne relacionados con antibióticos), aclacinomisininas, actinomicina autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-Norleucina, doxorubicina (incluido ADRIAMYCIN®, morfolino-doxorubicina, cianomorfolino do-

xorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina, la inyección de liposoma clorhidrato de doxorrubicina (DOXIL®) y deoxido-xorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcellomicina, mitomicinas como la mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiomicina, puomicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos como el metotrexato, gemcitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELODA®), epitolona, y 5-fluorouracilo (5-FU), análogos del ácido fólico como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato, análogos de la purina como la fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina, análogos de la pirimidina, como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmo-fur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos como calusterona, dromostanolone propionato, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; anti-suprarrenales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; 10 relleno de ácido fólico, como el ácido frolinico; aceglatona; aldofosfamida glucósido, ácido aminolevulínico; eniluracil; amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de elliptinium; etoglucido, nitrato de galio, hidroxiaurea, lentinan; lonidainina; maytansinoides como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacáridos PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; 15 rhizoxina; sizofirano; spirogermanium; -ácido tenuazónico; triaziquona 2,2',2''-triclorotrietilamina; tricotecenos (en particular, toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINA®, FILDESIN®); dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol pipobroman; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa, taxanos, *por ejemplo*, paclitaxel (TAXOL®), la formulación de nanopartículas de la ingeniería de albúmina de paclitaxel (ABRA-XANETM), y doxetaxel (TAXOTERE®); cloranbucil; 6-tioguanina, mercaptopurina, metotrexato; análogos de platino 20 como el cisplatino y el carboplatino, vinblastina (VELBAN®), platino; etopósido (VP-16); ifosfamida, mitoxantrona, vincristina (ONCOVIN®), oxaliplatino; leucovovin; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatrexato; daunomina; aminopterina; ibandronato, inhibidor RFS 2000 de la topoisomerasa; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como el ácido retinoico: sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores, así como combinaciones de dos o más de los anteriores como CHOP, una abreviatura para la terapia combinada de 25 ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina y prednisolona, y FOLFOX, una abreviatura de un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATINTM) en combinación con 5-FU y leucovovina.

También se incluyen en esta definición agentes anti-hormonales que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de las hormonas que pueden promover el crecimiento del cáncer, y están a menudo en la forma de 30 tratamiento sistémico o de todo el cuerpo. Pueden ser las hormonas mismas. Los ejemplos incluyen anti-estrógenos y los moduladores selectivos del receptor de estrógeno (SERMs), como, por ejemplo, el tamoxifeno (incluyendo tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno (EVISTA®), droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y toremifeno (FARESTON®), anti-progesterona, reguladores a la baja de receptores de estrógeno (ERD), agentes que funcionan para suprimir o apagar los ovarios, por ejemplo, agonistas de la hormona luteinizante-hormona 35 liberadora (LHRH), tales como acetato de leuprolida (LUPRON® y ELIGARD®), acetato de goserelina, acetato de buserelina y tripterelina; otros anti-andrógenos como la flutamida, nilutamida y la bicalutamida y los inhibidores de la aromatasa, que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol (MEGASE®), exemestano (AROMASIL®), formestania, fadrozol, vorozola (RIVISOR®), letrozol (FEMARA®), y anastrozol (ARIMIDEX®). Además, tal definición 40 de los agentes quimioterápicos incluye bifosfonatos como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® o OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAX®), pamidronato (AREDIA®), tiludronato (SKELID®), y risedronato (ACTONEL®), así como troxacitabina (un análogo 1,3-dioxolano de los nucleósidos citosina); oligonucleótidos antisentido, en particular los que inhiben la expresión de genes en las vías de señalización implicadas en la proliferación celular, como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras, y 45 factor de crecimiento epidérmico (EGF-R), vacunas, como la vacuna contra THERATOPE® y vacunas de terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN®, y vacuna VAXID®, inhibidor de la topoisomerasa 1 (por ejemplo, LURTOTECAN®); rrmRH (por ejemplo, ABARELIX®); ditosilato lapatinib (un inhibidor de molécula pequeña ErbB-2 y EGFR dual de la tirosina quinasa también conocido como GW572016); inhibidores COX-2 como el celecoxib (CELEBREX®), 4-(5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il) bencenosulfonamida, y sales 50 farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores.

El término "citocina" es un término genérico para las proteínas liberadas por una población de células que actúan en otra celda como mediadores intercelulares. Ejemplos de las citocinas son linfocinas, monocinas, y hormonas 55 peptídicas tradicionales. Se incluyen entre las citoquinas las hormonas de crecimiento como la hormona de crecimiento humano, hormona de crecimiento humana N-metionil y la hormona de crecimiento bovino, hormona paratiroidea, tiroxina, insulina, proinsulina, relaxina; prorelaxina; hormonas glicoproteínas como hormona estimulante del folículo (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH) y hormona luteinizante (LH), factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno de la placenta, factor de necrosis tumoral alfa y beta, sustancia inhibidora de Müller; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factores de crecimiento vascular 60 endotelial (por ejemplo, VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E), factor de crecimiento derivado de la placenta (PIGF), factores de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por ejemplo, PDGFA, PDGFB, PDGFC, PDGFD), integrina, (trombopoyetina TPO), factores de crecimiento nervioso, tales como NGF-alfa, factor de crecimiento plaquetario, de factores de crecimiento transformadores (TGF), como TGF-alfa y TGF-beta, factor de crecimiento de tipo insulina I y II; eritropoyetina (EPO), factores osteoinductivos; interferones como el interferón-alfa, beta y gamma, factores estimulantes de colonias (CSF), como macrófagos-CSF (M-CSF); granulocitos-macrófagos-CSF (GM-CSF), y granulocito-CSF (G-CSF), interleuquinas (IL), tales como la IL-1, IL-1alfa, IL-1beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20-IL-30; secretoglobina/uteroglobina; oncostatina M (OSM), factor de necrosis tumoral como TNF-alfa, o TNF-beta, y otros factores 65

polipéptidos incluyendo LIF y el ligando de equipo (KL). Como se usa aquí, el término incluye proteínas de las citocinas a partir de fuentes naturales o de cultivo de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia nativa.

5 El término “profármaco” que se utiliza en la presente solicitud se refiere a un precursor o de forma derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxico para las células tumorales en comparación con el fármaco original y es capaz de ser activado enzimáticamente o convertido en la forma parental más activa. Véase, por ejemplo, Wilman, “Prodrugs in Cancer Chemotherapy” Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) y Stella *et al.*, “Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery”, Directed Drug Delivery, Borchardt *et al.*, (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985). Los profármacos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptido, profármacos modificados D-aminoácido, profármacos glucosilados, profármacos que contienen beta-lactámicos, profármacos que contienen fenoxiacetamidas opcionalmente sustituidas o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida, 5-fluorocitosina y otros profármacos 5-fluorouridina que puede convertirse en el fármaco más activo libre de citotóxicos. Ejemplos de medicamentos citotóxicos que pueden ser derivatizados en una forma profármaco para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, los agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

Un “factor o agente angiogénico” es un factor de crecimiento que estimula el desarrollo de los vasos sanguíneos, por ejemplo, promueve la angiogénesis, el crecimiento de las células endoteliales, la estabilidad de los vasos sanguíneos, y/o vasculogénesis, etc., por ejemplo, los factores angiogénicos, incluyen, pero no están limitados a, por ejemplo, VEGF y los miembros de la familia del VEGF, PIGF, familia de PDGF, familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFs), ligandos TIE (Angiopoyetinas), efrinas, ANGPTL3, ANGPTL4, etc. También se incluyen los factores que aceleran la cicatrización de heridas, como la hormona del crecimiento, factor-I de crecimiento de tipo insulina (IGF-I), VIGF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), CTGF y los miembros de su familia, y TGF- α y TGF- β . Véase, por ejemplo, Klagsbrun y D’Amore, Annu. Rev. Physiol., 53:217-39 (1991); Streit y Detmar, Oncogene, 22:3172-3179 (2003); Ferrara y Alitalo, Nature Medicine 5 (12): 1359-1364 (1999); Tonini *et al.*, Oncogene, 22:6549-6556 (2003) (Por ejemplo, la Tabla 1 lista de factores angiogénicos), y, Sato Int. J. Clin. Oncol., 8:200-206 (2003).

Un “agente anti-angiogénesis” o “inhibidor de la angiogénesis” se refiere a sustancias de pequeño peso molecular, un polinucleótido, un polipéptido, una proteína aislada, una proteína recombinante, un anticuerpo o proteínas conjugadas o de fusión de la misma, que inhibe la angiogénesis, vasculogénesis, o de la permeabilidad vascular indeseable, ya sea directa o indirectamente. Por ejemplo, un agente anti-angiogénesis es un anticuerpo u otro antagonista de un agente angiogénico como se define arriba, por ejemplo, anticuerpos contra VEGF, los anticuerpos a los receptores de VEGF, pequeñas moléculas que bloquean la señalización del receptor de VEGF (por ejemplo, PTK787/ZK2284, SU6668). Agentes anti-angiogénesis también incluyen los inhibidores de la angiogénesis nativa, por ejemplo, angiostatina, endostatina, etc. Véase, por ejemplo, Klagsbrun y D’Amore, Annu. Rev. Physiol., 53:217-39 (1991); Streit y Detmar, Oncogene, 22:3172-3179 (2003) (Por ejemplo, la Tabla 3 que enumera terapia anti-angiogénica del melanoma maligno); Ferrara y Alitalo, Nature Medicine 5 (12): 1359-1364 (1999); Tonini *et al.*, Oncogene, 22:6549-6556 (2003) (Por ejemplo, la Tabla 2 que lista los factores antiangiogénicos), y, Sato Int. J. Clin. Oncol., 8:200-206 (2003) (Por ejemplo, en la Tabla 1 se enumeran los agentes anti-angiogénicos utilizados en ensayos clínicos).

La palabra “etiqueta” cuando se usa aquí, se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente con el polipéptido. La etiqueta puede ser detectable en ella misma (por ejemplo, las etiquetas de radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de una etiqueta enzimática, puede catalizar la modificación química de un compuesto o una composición de sustrato que es detectable.

Una molécula de ácido nucleico “aislada” es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminantes con la que normalmente se asocia en la fuente natural del ácido nucleico polipéptido. Una molécula de ácido nucleico aislada es distinta en la forma o disposición a la que se encuentra en la naturaleza. Moléculas aisladas de ácido nucleico por lo tanto se distinguen de la molécula de ácido nucleico, tal como existe en las células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que normalmente expresan el polipéptido que, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico se encuentra en una localización cromosómica distinta de la de las células naturales.

La expresión “secuencias de control” se refiere a las secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia de codificación operativamente unida en un organismo huésped en particular. Las secuencias de control que son adecuadas para los procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente, una secuencia de operador, y un sitio de unión del ribosoma. Las células eucariotas son conocidas por utilizar los promotores, las señales de poliadenilación, y potenciadores.

El ácido nucleico está “operativamente unido” cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN de una presecuencia o líder secretor está operativamente unido a ADN para un polipéptido si éste está expresado como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido, un promotor o potenciador está operativamente unido a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia, o un sitio de unión del ribosoma está unido operativamente a una secuencia de codificación si se coloca con el fin de facilitar la traducción. En general, “operativamente unido” significa que las secuencias de ADN vinculadas son contiguas, y, en el caso de un líder de secreción, contiguo y en la lectura de fase. Sin embargo, los reforzadores no

tienen que ser contiguos. La vinculación es realizada mediante uniones en los sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se utilizan los adaptadores de oligonucleótidos sintéticos o enlazadores de acuerdo con la práctica convencional.

- 5 Como se usa aquí, las expresiones “célula”, “línea celular”, y “cultivo celular” se usan indistintamente y todas estas designaciones incluyen la progenie. Así, las palabras “transformantes” y “células transformadas”: incluyen el tema principal de la célula y los cultivos derivados, sin tener en cuenta el número de transferencias. También se entiende que todos los descendientes no pueden ser exactamente idénticos en contenido de ADN, debido a las mutaciones deliberadas o inadvertidas. Está incluida la progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica como
10 se detecta en células transformadas originalmente. Donde se prevén denominaciones distintas, serán evidentes a partir del contexto.

ANGPTL4

- 15 Proteína angiopoyetina de tipo 4 (ANGPTL4) es una proteína secretada y es miembro de la familia angiopoyetina. También es conocida como proteína relacionada con el fibrinógeno hepático/angiopoyetina (HFARP) (Kim *et al.*, Biochem. J. 346:603-610 (2000)), PGAR (proteína relacionada con la angiopoyetina PPAR γ) (Yoon, *et al.*, Mol. Cell Biol. 20:5343-5349 (2000)), factor adiposo inducido por ayuno (FAIF) (Kerten *et al.*, J. Biol. Chem., 275:28488-28493 (2000)); proteína relacionada con angiopoyetina (ARP-4); NL2 (véase Patente EE.UU. N° 6348350; 6.372.491 y 6.455.496), y Ang6.

- La proteína ANGPTL4 de humanos es una proteína de 406 aminoácidos (por ejemplo, Patentes de los EE.UU. 6.348.350, 6.372.491 & 6.455.496), mientras que el ANGPTL4 de ratón es una proteína de 410 aminoácidos (Kim *et al.*, Biochem. J. 346:603-610 (2000)). El ratón y el humano comparten aproximadamente el 75% de identidad en
25 el nivel de aminoácidos. Kim *et al.*, Biochem. J. 346:603-610 (2000). ANGPTL4 tiene un péptido señal, tres sitios potenciales de N-glicosilación, y cuatro cisteínas que pueden estar implicadas en el enlace disulfuro intramolecular. Por ejemplo, ANGPTL4 forma estructuras moleculares más altas, por ejemplo, como se indica en el Figura 3, Panel A. Véase también, por ejemplo, GE *et al.*, J. Biol. Chem., 279 (3):2038-2045 (2004); GE *et al.*, J. Lipid Res., 45:2071-2079 (2004), y, Mandard *et al.*, J. of Biol. Chem., 279 (33):34411-34420 (2004). ANGPTL4 también puede ser
30 procesada proteolíticamente. Véase también, por ejemplo, GE *et al.*, J. Biol. Chem., 279 (3):2038-2045 (2004), y, Mandard *et al.*, J. of Biol. Chem., 279 (33):34411-34420 (2004). Como se describe aquí, la sustitución de R162G y R164E de ANGPTL4 resulta en la variante ANGPTL4 desplazándose a mayor peso molecular en un gel de SDS que la proteína de tipo salvaje (o nativa), (véase Figura 3, Panel B).

- 35 Regiones conservadas de la familia de la angiopoyetina incluyen un dominio super hélice y un dominio de tipo fibrinógeno C-terminal (FBN). Véase, por ejemplo, Kim *et al.*, Biochem. J. 346:603-610 (2000). Se sugiere que ANGPTL4 se procesa proteolíticamente de manera regulada para liberar un dominio de tipo fibrinógeno C-terminal. Véase, por ejemplo, GE *et al.*, J. Biol. Chem., 279 (3):2038-2045 (2004). Otros miembros de la familia de la angiopoyetina incluyen angiopoyetina 1, angiopoyetina 2 y angiopoyetina 3/angiopoyetina 4, que se unen al receptor Tie2.
40 Véase, por ejemplo, Davis *et al.*, Cell 87, 1161-1169 (1996); Maisonnier *et al.*, Science 277, 55-60 (1997); Valenzuela *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 96, 1904-1909 (1999), y, Patentes de EE.UU. N° 5.521.073; 5.650.490, y, 5.814.464. Angiopoyetina 1 y 4 aparecen como un agonista del receptor Tie2, mientras angiopoyetina 2 y 3 parecen ser un antagonista (y, posiblemente, un agonista) para el receptor Tie2. Véase, por ejemplo, Folkman y D'Amore, Cell, 87:1153-1155 (1996); Suri *et al.*, Cell, 87:1171-1180 (1996); Maisonnier *et al.*, Science 277:55-60 (1997), y, Ward & Dumont, Seminars in Cell & Developmental Biology, 13:19-27 (2002).

- Otro miembro de la familia, proteína 3 de tipo angiopoyetina (ANGPTL3) es un factor angiogénico que se une a la integrina $\alpha\beta_3$. Véase, por ejemplo, Solicitud de patente en EE.UU. 20030215451, publicada el 20 de noviembre 2003, y Camenisch *et al.*, J. Biol. Chem., 277 (19):17281-17290 (2002). ANGPTL3 no parece que se una al receptor
50 Tie2. Camenisch *et al.*, Journal of Biol. Chem. 277 (19):17281-17290 (2002). ANGPTL3 es también un regulador de los niveles de lípidos en plasma. Véase, por ejemplo, Koishi *et al.* Nat. Genetics 30:151-157 (2002).

- ANGPTL4 se une a la integrina $\alpha\beta_5$. Véase, por ejemplo, Figuras 11, 12 y 13. La integrina $\alpha\beta_5$ es un receptor de proteínas de matriz extracelular incluyendo vitronectina, y Del-1 (véase, por ejemplo, Stupack y Chersesh, Journal of Cell Science 115:3729-3738 (2002)). Integrinas alfa V se han implicado en la progresión tumoral y la metástasis.
55 Véase, por ejemplo, Marshall, F y J Hart, R Semin. Cancer Biol. 7 (3): 129-38 (1996). Además, una función de las integrinas alfa-V, durante la angiogénesis también se ha demostrado. Véase, por ejemplo, Eliceiri, BP y Chersesh, DA Molecular Medicine 4: 741-750 (1998). Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal para $\alpha\beta_5$ se ha demostrado que inhibe la angiogénesis inducida por VEGF en la córnea de conejo y el modelo de membrana corioalantoideas del pollo. Véase, por ejemplo, Friedlander, MC, *et al.*, Science 270:1500-1502-(1995). Antagonistas de $\alpha\beta_5$ y $\alpha\beta_5$ también está
60 demostrado que inhiben el factor de crecimiento tumoral y la angiogénesis inducida. Véase, por ejemplo, Eliceiri y Chersesh, Current Opinion in Cell Biology, 13:563-568 (2001).

- La invención proporciona composiciones de moduladores, por ejemplo, agonistas o antagonistas, de proteínas de tipo angiopoyetina 4 (ANGPTL4) y combinaciones de estos moduladores con otros agentes terapéuticos. Por ejemplo, se proporcionan las combinaciones de los antagonistas de ANGPTL4 con agentes anti-cáncer y los procedimientos para su uso en el bloqueo o la reducción del crecimiento del tumor o el crecimiento de las células cancerosas. La invención también proporciona procedimientos para bloquear o reducir el crecimiento recurrente del tumor o recaída de

crecimiento de células del cáncer con antagonistas de ANGPTL4 y/o otros agentes anti-cáncer. También se proporcionan composiciones de los antagonistas de ANGPTL4 y combinaciones de agentes antiangiogénicos y procedimientos para su uso en el bloqueo o la reducción de la neovascularización de las neoplasias o no neoplasias.

5 *Moduladores ANGPTL4 y usos de los mismos*

Moduladores de ANGPTL4 son moléculas que modulan la actividad de ANGPTL4, por ejemplo, los agonistas y antagonistas. El término “agonista” se utiliza para referirse a análogos péptidos y no péptidos de ANGPTL4, y a los anticuerpos que unen específicamente tales moléculas ANGPTL4, siempre que tengan la capacidad de señal a través
10 de un receptor ANGPTL4 nativo (por ejemplo, integrina $\alpha_v\beta_5$). El término “agonista” se define en el contexto de la función biológica de un receptor de ANGPTL4 (por ejemplo, $\alpha_v\beta_5$). En algunas realizaciones, los agonistas poseen la actividad biológica de un ANGPTL4 nativo, tal como se definió anteriormente, tales como la promoción de la proliferación, migración, y/o adhesión de las células y/o modulación de la homeostasis de lípidos.

15 El término “antagonista” se utiliza para referirse a las moléculas que tienen la capacidad de inhibir la actividad biológica de ANGPTL4 independientemente de si tienen la capacidad de unir a ANGPTL4 o su receptor, por ejemplo, $\alpha_v\beta_5$. En consecuencia, los antagonistas que tienen la capacidad de unir a ANGPTL4 o su receptor incluyen anticuerpos anti-ANGPTL4 y anti- $\alpha_v\beta_5$. El antagonista ANGPTL4 puede ser evaluado por, por ejemplo, la inhibición de la actividad de ANGPTL4, por ejemplo, adhesión, migración, proliferación, y/o modulación de la actividad de homeostasis de los lípidos de ANGPTL4. Con respecto a la actividad de los receptores de la integrina $\alpha_v\beta_5$, un modulador de un receptor de la integrina $\alpha_v\beta_5$ puede ser determinado por procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar el procedimiento descrito por el J. W. Smith *et al.* en J. Biol. Chem. 265:12267-12271 (1990).

25 *Usos terapéuticos*

ANGPTL4 está implicado como un objetivo de cáncer. ANGPTL4, cuando se expresa en algunas células tumorales, causa la proliferación de células tumorales *in vitro* e *in vivo*, (véase, por ejemplo, Figura 4, Figura 5, Figura 7 y Figura 8, Panel A, y Panel B). Cuando ANGPTL4 se expresa en los tumores tratados con un factor anti-angiogénesis, por ejemplo, el anticuerpo anti-VEGF, el tumor se puede mantener la capacidad de crecer (véase, por ejemplo, Figura 8, Panel C). ANGPTL4 también causa la migración de células tumorales (véase, por ejemplo, Figura 9). También se ha demostrado que es aumentada en cánceres renales. Véase, por ejemplo, expediente número P5032R1; WO 02107941, y, Le Jan *et al.*, American Journal of Pathology, 162 (5):1521-1528 (2003). Además, ANGPTL4 es un factor proangiogénico (véase, por ejemplo, Le Jan S. *et al.*, Am. J. Pathol., 162 (5): 1521-1528 (2003)), que son objetivos para la terapia del cáncer. Como el VEGF (Shweiki *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., EE.UU. 92:768-772 (1995),
30 la expresión de ANGPTL4 aumenta en respuesta a la hipoxia. Véase, por ejemplo, Le Jan *et al.*, American Journal of Pathology, 162 (5):1521-1-528-(2003).

ANGPTL4 se une a las células tumorales, por ejemplo, las células A673, bajo diferentes condiciones (por ejemplo, Figura 6, Panel A y B). Como hemos visto en, por ejemplo, Figura 4, Panel A y Panel B, ANGPTL4 estimula algún crecimiento de células tumorales *in vitro* cuando las células son transducidas con una construcción de expresión que expresa ANGPTL4. Figura 4, Panel C también ilustra que la adición de medios acondicionados de células COS7 transducidas con ANGPTL4 induce la proliferación de las células A673. Véase también, Figura 7, Panel A y B. ANGPTL4 induce la proliferación de células de la proliferación de A673 cuando la ANGPTL4 está revestida en placas de cultivo (véase, Figura 5), pero no induce la proliferación celular de las células epiteliales renales, la célula mesangial renal o HUVEC. ANGPTL4 también induce la migración celular de las células tumorales. Véase, por
45 ejemplo, Figura 9.

ANGPTL4 se expresa predominantemente en el tejido adiposo, placenta, hígado y riñón y también es regulada en ob/ob (leptina knock-out) y db/db (knock-out del receptor de leptina) en ratones. Véase, por ejemplo, Yoon *et al.*, Mol. Cell. Biol. 20:5343-5349 (2000); Kim *et al.*, Biochem. J., 346:603-610 (2000); Kersten *et al.*, J. Biol. Chem., 275:28488-28493 (2000), y, Le Jan *et al.*, American Journal of Pathology 162 (5):1521-1528 (2003). También se informó que ANGPTL4 es un modulador de los lípidos y el inhibidor de la lipoproteína lipasa. Véase, por ejemplo, Yu *et al.*, PNAS EE.UU. 102 (5):1767-1772 (2005); Yoshida *et al.*, J. Lipid Res. 43:1770-1772 (2002), y, Wiesner *et al.*, J. Endocrinology 180: R1-R6 (2004). La expresión ANGPTL4 también es inducida por la PPAR gamma y alfa en el
55 tejido adiposo, y es inducida por el hambre. También modula la proliferación de los pre-adipocitos y hepatocitos, y/o la migración de las células pre-adipocitos, junto con la modulación de los niveles de triglicéridos y colesterol en el suero. Ver, solicitud de patente EE.UU. provisional 60/589, 875, y expediente legal P2156R1 presentada oportunamente y publicada como WO 2006/014678. Los investigadores han informado de las conexiones entre la angiogénesis y la adipogénesis. Véase, por ejemplo, Sierra-Honigmann *et al.* “Biological Action of Leptin as an Angiogenic Factor” Science 281:1683-1686; (1998); Rupnick *et al.*, “Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature” Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 99(16):10730-10735 (2002); y Fukumura *et al.*, “Paracrine Regulation of Angiogenesis and Adipocyte Differentiation During *In Vivo* Adipogenesis”. Circ. Res. 93:e88-e97 (2003).
60

Se ha previsto que, de acuerdo con la invención, los moduladores ANGPTL4 y/o combinaciones de moduladores
65 ANGPTL4 y otros agentes terapéuticos pueden ser usados para tratar varias neoplasias o condiciones no neoplásicas. En una realización, moduladores ANGPTL4, por ejemplo, los antagonistas de ANGPTL4, se utilizan en la inhibición del crecimiento de la célula de cáncer o del tumor. Por ejemplo, como se ve en Figura 10, Panel A y B, los anticuerpos policlonales ANGPTL4 inhiben el crecimiento de células tumorales en forma dosis-dependiente. ANGPTL4 puede

causar la migración de las células tumorales (ver, por ejemplo, Figura 9). Está previsto que, de acuerdo con la invención, los antagonistas de ANGPTL4 también pueden ser utilizados para inhibir la metástasis de un tumor. ANGPTL4 también induce la migración de los pre-adipocitos. Ver, solicitud de patente provisional EE.UU. 60/589, 875, y el archivo legal P2156R1 presentado oportunamente y publicado como WO 2006/014678. En algunas realizaciones, uno o más agentes anti-cáncer pueden ser administrados con antagonistas de ANGPTL4 para inhibir el crecimiento de células de cáncer o del tumor. Ver la sección titulada *Las terapias de combinación* en este documento.

Algunos ejemplos de trastornos neoplásicos a ser tratados incluyen, pero no están limitados a, los descritos en este documento bajo los términos “cáncer” y “canceroso”. Condiciones no neoplásicas que son susceptibles de tratamiento con antagonistas de la invención incluyen, pero no están limitadas a, por ejemplo, hipertrofia no deseada o aberrante, artritis, artritis reumatoide (AR), psoriasis, placas de psoriasis, sarcoidosis, aterosclerosis, placas de ateroma, edema de infarto de miocardio, diabetes y otras retinopatías proliferativas incluyendo retinopatía del prematuro, fibrosis retrolental, glaucoma neovascular, degeneración macular, edema macular diabético, neovascularización corneal, neovascularización del injerto de córnea, rechazo del injerto de córnea, neovascularización de retina/coroidea, neovascularización del ángulo (rubeosis), enfermedad neovascular ocular, reestenosis vascular, malformaciones arteriovenosas (MAV), meningioma, hemangioma, angiofibroma, hiperplasias tiroideas (incluyendo la enfermedad de Grave), trasplante corneal y de otros tejidos, inflamación crónica, inflamación pulmonar, lesión pulmonar aguda/SDRA, sepsis, hipertensión pulmonar primaria, derrames pulmonares malignos, edema cerebral (por ejemplo, relacionado con el accidente cerebrovascular agudo/lesión cerrada en la cabeza/trauma), inflamación sinovial, formación de pannus en la AR, miositis osificante, formación ósea hipertrófica, osteoartritis (OA), ascitis refractaria, síndrome de ovario poliquístico, endometriosis, 3a separación de las enfermedades de líquidos (pancreatitis, síndrome compartimental, quemaduras, enfermedades del intestino), fibromas uterinos, parto prematuro, inflamación crónica como IBD (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), rechazo del injerto renal, enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome nefrótico, crecimiento no deseado o aberrante de la masa de tejido (no cancerosas), obesidad, crecimiento de la masa de tejido adiposo, articulaciones con hemofilia, cicatrices hipertróficas, inhibición del crecimiento del pelo, síndrome de Osler-Weber, fibroplasias retrolental granuloma piógeno, esclerodermia, tracoma, adherencias vasculares, sinovitis, dermatitis, preeclampsia, ascitis, derrame pericárdico (como el asociado con pericarditis) y derrame pleural.

Moduladores de ANGPTL4, por ejemplo, agonistas o activadores de ANGPTL4, pueden ser utilizados para los tratamientos de los trastornos patológicos. Moduladores de ANGPTL4, por ejemplo, agonistas de ANGPTL4, pueden ser utilizados en el tratamiento de los trastornos patológicos donde se desea la angiogénesis o neovascularización y/o la hipertrofia, que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, trauma vascular, heridas, cortes, incisiones, quemaduras, úlceras (por ejemplo, úlceras diabéticas, úlceras por presión, úlceras hemofílicas, úlceras varicosas), crecimiento del tejido, aumento de peso, enfermedad arterial periférica, inducción del parto, crecimiento del pelo, epidermolisis ampollosa, atrofia de la retina, fracturas de hueso, fusiones espinales de hueso, roturas de menisco, etc. Véase también, solicitud de patente provisional EE.UU. 60/589, 875, y archivo legal P2156R1 presentada oportunamente y publicado como WO 2006/014678.

40 *Terapias de combinación*

Como se indicó anteriormente, la invención proporciona terapias combinadas en el que un antagonista de ANGPTL4 se administra con otro tratamiento. Por ejemplo, los antagonistas de ANGPTL4 se utilizan en combinación con terapias anti-cáncer o terapias anti-neovascularización para tratar varias condiciones neoplásicas o no neoplásicas. En una realización, la condición neoplásica o no neoplásica se caracteriza por trastornos patológicos asociados con la angiogénesis aberrante o no deseada. El antagonista ANGPTL4 puede ser administrado en serie o en combinación con otro agente que es eficaz para esos fines, ya sea en la misma composición o en composiciones separadas. Como alternativa, o además, pueden ser administrados múltiples inhibidores de ANGPTL4.

La administración del antagonista y/o agentes de la invención puede hacerse simultáneamente, por ejemplo, como una composición única o como dos o más composiciones utilizando la misma o diferentes vías de administración. Como alternativa, o además, la administración puede hacerse de forma secuencial, en cualquier orden. En algunas realizaciones, los intervalos van desde minutos a días, o semanas a meses, pueden estar presente entre las administraciones de los dos o más composiciones. Por ejemplo, el agente anti-cáncer puede ser administrado en primer lugar, seguido por el inhibidor ANGPTL4. Sin embargo, la administración simultánea o la administración del antagonista ANGPTL4 primero también están contempladas.

Las cantidades efectivas de los agentes terapéuticos administrados en combinación con un antagonista de los ANGPTL4 será a discreción del médico o veterinario. La administración y el ajuste de la dosis se hacen para lograr un manejo máximo de las condiciones a ser tratadas. La dosis, además, dependerá de factores como el tipo de agente terapéutico que se utilizará y el paciente específico a tratar. Las dosis adecuadas para el agente anti-cáncer son las que se utilizan actualmente y se pueden disminuir debido a la acción combinada (sinergia) del agente anti-cáncer y el antagonista ANGPTL4. En algunas realizaciones, la combinación de los inhibidores potencia la eficacia de un único inhibidor. El término “potenciar” se refiere a una mejora en la eficacia de un agente terapéutico en su dosis común o aprobada. Ver también la sección titulada *Composiciones farmacéuticas* en este documento.

Normalmente, los antagonistas ANGPTL4 y agentes anti-cáncer son adecuados para las mismas o similares enfermedades para bloquear o reducir un trastorno patológico, como el crecimiento del tumor o crecimiento de una célula cancerosa. En una realización el agente anti-cáncer es un agente anti-angiogénesis.

La terapia antiangiogénica en relación con el cáncer es una estrategia de tratamiento para el cáncer dirigida a inhibir el desarrollo de los vasos sanguíneos del tumor necesarios para proporcionar los nutrientes para apoyar el crecimiento del tumor. Debido a que la angiogénesis está implicada en el crecimiento del tumor primario y la metástasis, el tratamiento antiangiogénico aportado por la invención es capaz de inhibir el crecimiento neoplásico de tumor en el sitio principal, así como la prevención de metástasis de los tumores en los sitios secundarios, lo que permite el ataque de los tumores por otras terapias.

Muchos agentes anti-angiogénicos han sido identificados y son conocidos en la técnica, incluidos los enumerados en la presente, por ejemplo, que figuran en las definiciones, y por, por ejemplo, Carmeliet y Jain, *Nature* 407:249-257 (2000); Ferrara *et al.*, *Nature Reviews: Drug Discovery*, 3:391-400 (2004), y Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003). Véase también, Solicitud de Patente EE.UU. US20030055006. En una realización, el antagonista ANGPTL4 se utiliza en combinación con un anticuerpo neutralizante anti-VEGF (o fragmento) y/u otro antagonista de VEGF o un antagonista del receptor de VEGF, incluyendo pero no limitado a, por ejemplo, receptor de VEGF soluble (por ejemplo, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, neuropilinas (por ejemplo, NRP1, NRP2)) fragmentos, aptámeros capaces de bloquear el VEGF o VEGFR, neutralizando los anticuerpos anti-VEGFR, inhibidores de molécula de bajo peso de tirosina quinasa VEGFR (RTK), estrategias antisentido para el VEGF, ribozimas contra el VEGF o los receptores de VEGF, variantes antagonistas de VEGF, y cualquier combinación de los mismos. Como alternativa, o además, dos o más inhibidores de la angiogénesis pueden ser co-administrados al paciente. En ciertas realizaciones, uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, agentes anti-cáncer, se puede administrar en combinación con un antagonista de ANGPTL4 y un agente anti-angiogénesis.

En ciertos aspectos de la invención, otros agentes terapéuticos útiles para la terapia de combinación del tumor con un antagonista de la invención incluyen terapias para el cáncer, (por ejemplo, cirugía, tratamientos radiológicos (por ejemplo, con la participación de irradiación o de la administración de sustancias radiactivas), quimioterapia, tratamiento con agentes anti-cáncer que figuran en este documento y conocidos en la técnica, o combinaciones de ellos). Como alternativa, o además, dos o más anticuerpos que unen el mismo o dos o más antígenos diferentes revelados en este documento pueden ser co-administrados al paciente. A veces, puede ser beneficioso administrar también uno o más citoquinas al paciente.

Agentes quimioterapéuticos

En ciertos aspectos, la invención proporciona un procedimiento para bloquear o reducir el crecimiento del tumor o el crecimiento de una célula de cáncer, mediante la administración de cantidades eficaces de un antagonista de ANGPTL4 y/o un inhibidor(es) de la angiogénesis y uno o más agentes de quimioterapia a un paciente susceptible al, o diagnosticado con, cáncer. Una variedad de agentes quimioterápicos pueden ser utilizados en los procedimientos de tratamiento combinado de la invención. Una lista ejemplar y no limitativa, de agentes quimioterapéuticos se contemplan en el presente documento bajo "Definición".

Como se comprenderá por los de conocimientos básicos en la técnica, la dosis adecuada de agentes quimioterapéuticos será generalmente alrededor de las ya empleados en las terapias clínicas en donde los quimioterapéuticos se administran solos o en combinación con otros quimioterapéuticos. La variación en la dosificación probablemente se producirá en función de la condición a tratar. El médico que administra el tratamiento será capaz de determinar la dosis apropiada para el sujeto individual.

Crecimiento tumoral reincidente

La invención también proporciona procedimientos y composiciones para inhibir o prevenir el crecimiento recidiva del tumor o la recaída de crecimiento celular del cáncer. Por ejemplo, Figura 8, Panel C ilustra esquemáticamente la capacidad de un tumor en tratamiento con un anticuerpo anti-VEGF (Avastin) para escapar del tratamiento (por ejemplo, un tipo de recaída) cuando el tumor expresa también ANGPTL4.

El crecimiento de recaída del tumor o el crecimiento de recaída de células de cáncer se utiliza para describir una condición en la que los pacientes sometidos o en tratamiento o con uno o más tratamientos actualmente disponibles (por ejemplo, terapias del cáncer, como quimioterapia, radioterapia, cirugía, terapia hormonal y/o terapia biológica/inmunoterapia, en particular un régimen terapéutico estándar para el cáncer en particular) no es clínicamente adecuada para el tratamiento de los pacientes o los pacientes ya no reciben ningún efecto beneficioso de la terapia de tal manera que estos pacientes necesitan un tratamiento efectivo adicional. Como se usa aquí, la frase también puede referirse a una condición del paciente "no-respondedor/refractario", por ejemplo, que describe a los pacientes que responden a la terapia aunque sufren de efectos secundarios, desarrollan resistencia, no responden a la terapia, no responden satisfactoriamente a la terapia, etc. En varias realizaciones, un cáncer es el crecimiento del tumor reincidente o recaída del crecimiento de la célula de cáncer donde el número de células de cáncer no se ha reducido considerablemente, o se ha incrementado, o el tamaño del tumor no se ha reducido considerablemente, o ha aumentado, o falla cualquier reducción adicional en el tamaño o en el número de células cancerosas. La determinación de si las células cancerosas son el crecimiento del tumor reincidente o recaída del crecimiento celular del cáncer se puede hacer ya sea *in vivo* o *in vitro* por cualquier procedimiento conocido en la técnica para ensayar la eficacia del tratamiento en las células de cáncer, utilizando las acepciones aceptadas en el arte de "recaída" o "refractario" o "no respondedor" en ese contexto.

La invención proporciona procedimientos para bloquear o reducir el crecimiento del tumor reincidente o recaída del crecimiento de células de cáncer en un sujeto mediante la administración de uno o más antagonistas ANGPTL4 de la invención para bloquear o reducir el crecimiento del tumor reincidente o recaída del crecimiento celular del cáncer en cuestión. En algunas realizaciones, el antagonista ANGPTL4 puede ser administrado después de la terapia del cáncer. En algunas realizaciones, el ANGPTL4 es administrado simultáneamente con la terapia del cáncer. Como alternativa, o además, la terapia con antagonistas de ANGPTL4 alterna con otra terapia de cáncer, que puede realizarse en cualquier orden. La invención también incluye procedimientos para administrar uno o más anticuerpos inhibidores ANGPTL4 para prevenir la aparición o reaparición del cáncer en pacientes con predisposición a tener cáncer. En general, el sujeto era o es al mismo tiempo sometido a la terapia del cáncer. En una realización, el tratamiento del cáncer es el tratamiento con un agente anti-angiogénesis. El agente anti-angiogénesis incluye a los conocidos en la técnica y los que se encuentran en las definiciones en el mismo. En una realización, el agente anti-angiogénesis es un anti-VEGF o fragmento de anticuerpos neutralizantes (por ejemplo, humanizado A4.6.1, AVASTIN® (Genentech, South San Francisco, CA), Y0317, M4, G6, B20, 2C3, etc.). Véase, e.g., Patentes U. S. 6.582.959, 6.884.879, 6.703.020; WO98/45332; WO 96/30046; WO94/10202; EP 0666868B1; solicitudes de patente EE.UU. 20030206899, 20030190317, 20030203409, y 20050112126; Popkov *et al.*, Journal of Immunological Methods 288:149-164 (2004), y, el archivo legal PR2072 No.-4. Se pueden administrar agentes adicionales en combinación con antagonistas de ANGPTL4 para bloquear o reducir el crecimiento del tumor reincidente o recaída del crecimiento celular del cáncer, por ejemplo, véase la sección titulada *Las terapias de combinación* en este documento.

En una realización, los antagonistas ANGPTL4 de la invención, u otras terapias que reducen la expresión de ANGPTL4, se administran para revertir la resistencia o reducir la sensibilidad de las células cancerosas en ciertos agentes biológicos, hormonales, de radiación y quimioterapéuticos, volviendo a sensibilizar las células cancerosas para uno o más de estos agentes, los cuales pueden ser administrados (o seguirá siendo administrados) para tratar o controlar el cáncer, en particular para evitar la metástasis.

Anticuerpos

Los anticuerpos de la invención incluyen anti-ANGPTL4 y fragmentos de anticuerpos anti-ANGPTL4, anticuerpos que son los agentes antiangiogénicos o inhibidores de la angiogénesis, anticuerpos que son agentes contra el cáncer, anticuerpos a un receptor de ANGPTL4, por ejemplo, anticuerpos anti- $\alpha_v\beta_5$, u otros anticuerpos aquí descritos. Anticuerpos de ejemplo incluyen, por ejemplo, anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, fragmentos, multiespecíficos, heteroconjugados, polivalentes, función efecto, etc.

Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos de la invención pueden comprender anticuerpos policlonales. Procedimientos de preparación de anticuerpos policlonales son conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, los anticuerpos policlonales contra un anticuerpo de la invención crecen en animales mediante una o varias inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (IP) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno correspondiente a una proteína que es inmunogénica en las especies a inmunizar, *por ejemplo*, hemocianina de molusco, albúmina sérica, tiroglobulina bovina, o un inhibidor de tripsina de la soja usando un agente bifuncional o de derivación, por ejemplo, éster sulfosuccinimida maleimidobenzóilo (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 , o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, donde R y R¹ son diferentes grupos alquilo.

Los animales están vacunados contra una molécula de la invención, conjugados inmunogénicos, o derivados mediante la combinación, *por ejemplo*, de 100 mg o 5 mg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund y mediante la inyección de la solución por vía intradérmica, en múltiples sitios. Un mes más tarde, los animales son inyectados con 1/5 al 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund por vía subcutánea en varios sitios. De siete a 14 días más tarde a los animales se les retira sangre y el suero se ensaya para la titulación de anticuerpos. Los animales son inyectados hasta las mesetas del título. Típicamente, el animal se inyecta con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado con una proteína diferente y/o a través de un reactivo de reticulación diferente. Los conjugados también se pueden hacer en cultivo de células recombinantes como fusiones de proteínas. Además, agentes de concentración tales como aluminio son convenientemente utilizados para mejorar la respuesta inmune.

Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales contra un antígeno aquí descrito se pueden hacer utilizando el procedimiento de hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, Nature, 256:495 (1975), o se puede hacer mediante procedimientos de ADN recombinante (patente US 4.816.567).

En el procedimiento de hibridoma, un ratón u otro animal huésped adecuado, tal como un hámster o mono macaco, se inmuniza tal como se describe anteriormente para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unen específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos pueden ser inmunizados *in vitro*. A continuación, los linfocitos se fusionan con las células de mieloma con un agente de fusión adecuado, tal como polietileno glicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59 103 (Academic Press, 1986)).

Las células del hibridoma así preparado se siembran y se cultivan en un medio de cultivo adecuado que normalmente contiene una o varias sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas típicamente incluye hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que previenen el crecimiento de las células deficientes en HGPRT.

Las células del mieloma típicas son aquellas que se fusionan de manera eficiente, soportan altos niveles de producción estables de anticuerpos mediante las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Entre las mismas, las líneas celulares de mieloma preferidas son líneas de mieloma de ratón, tal como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11, disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, EE.UU., y células SP-2 o X63-AG8-653 disponibles en la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, EE.UU. Las líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humanas también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

El medio de cultivo en el que las células de hibridoma están creciendo se ensaya para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra, por ejemplo, ANGPTL4, $\alpha_v\beta_5$, o una molécula de angiogénesis. La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma puede ser determinada mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radio-inmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente enlazado con enzimas (ELISA). Estas técnicas y ensayos son conocidos en la técnica. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede, por ejemplo, determinarse mediante análisis de Scatchard de Munson y Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980).

Después de detectar que las células de hibridoma producen los anticuerpos de la especificidad, afinidad, y/o actividad deseadas, los clones pueden ser subclonados mediante procedimientos de dilución de limitación y cultivados mediante procedimientos estándar (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células se pueden cultivar en hibridomas *in vivo* como tumores de ascitas en un animal.

Los anticuerpos monoclonales secretados mediante los subclones están debidamente separados del medio de cultivo, fluido de ascitas o suero mediante procedimientos convencionales de purificación de las inmunoglobulinas, como por ejemplo, proteína A-sefariosa, cromatografía de hidroxipatita, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos monoclonales pueden ser realizados mediante procedimientos de ADN recombinante, tales como los descritos en la patente US 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales es fácilmente aislado y secuenciado utilizando procedimientos convencionales (*por ejemplo*, mediante el uso de sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos monoclonales). Las células del hibridoma sirven como fuente de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede poner en vectores de expresión, que luego se transfectan en células huésped, tales como células *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que no producen otra proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. La producción de anticuerpos recombinantes se describe con más detalle a continuación.

En otra realización, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos pueden aislarse de las librerías de fagos de anticuerpos generados mediante las técnicas descritas en McCafferty *et al.*, Nature, 348:552-554 (1990). Clackson *et al.*, Nature, 352:624-628-(1991) Y Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222:581 597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos de ratón y humanos, respectivamente, usando librerías de fagos. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (rango nM) barajando la cadena (Marks *et al.*, Bio/Technology, 10:779-783 (1992)), así como una infección combinatoria y la recombinación *in vivo* como una estrategia para la construcción de librerías de fagos muy grandes (Waterhouse *et al.*, Nuc. Ácidos. Res., 21:2265-2266 (1993)). Así, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de hibridoma de anticuerpo monoclonal para el aislamiento de los anticuerpos monoclonales.

El ADN también puede modificarse, por ejemplo, mediante la sustitución de la secuencia de codificación para dominios constantes humanos de cadena pesada y ligera en lugar de secuencias homólogas murinas (patente US 4.816.567; Morrison, *et al.*, Proc. Natl Acad Sci. EE.UU., 81:6851 (1984)), o mediante enlaces covalentes que unen la secuencia codificadora de inmunoglobulina a la totalidad o parte de la secuencia codificante para un polipéptido no inmunoglobulina.

Típicamente, estos polipéptidos no inmunoglobulinas son sustituidos por los dominios constantes de un anticuerpo, o son sustituidos por dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo quimérico bivalente que comprende un sitio de combinación de antígeno que tiene la especificidad para un antígeno y otro sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad para un antígeno diferente.

Anticuerpos humanizados y humanos

Los anticuerpos de la invención pueden comprender anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en el mismo desde una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se refieren a menudo como residuos de “importación”, que se toman típicamente desde un dominio variable “de importación”. La humanización puede realizarse básicamente según el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, Ciencia, 239:1534-1536 (1988)), mediante la sustitución de secuencias CDR o CDRs de roedores por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, estos anticuerpos “humanizados” son anticuerpos quiméricos (patente US 4.816.567) en los que sustancialmente menos que un dominio intacto variable humano ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y, posiblemente, algunos residuos de FR son sustituidos por residuos de sitios análogos en los anticuerpos de roedor.

La elección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para utilizarse en la fabricación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el llamado procedimiento de “mejor ajuste”, la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba contra toda la librería de secuencias de dominio variables humanas conocidas. La secuencia humana, que es la más cercana a la de los roedores, se acepta como marco humanos (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia *et al.*, J. Mol. Biol., 196:901 (1987)). Otro procedimiento utiliza un marco particular, derivado de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo marco puede utilizarse para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 89:4285 (1992); Presta *et al.*, J. Immunol., 151:2623 (1993)).

También es importante que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, según un procedimiento típico, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos conceptuales humanizados utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están comúnmente disponibles y son familiares para los expertos en la materia. Están disponibles programas de ordenador que ilustran y muestran las probables estructuras tridimensionales de conformación de las secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas muestras permite analizar el posible papel de los residuos en el funcionamiento de la secuencia candidata de inmunoglobulina, *es decir*, el análisis de los residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos FR pueden ser seleccionados y combinados de los receptores y las secuencias de importación de modo que se consigan las características deseadas de los anticuerpos, tales como mayor afinidad por el antígeno(s) objetivo. En general, los residuos CDR están directamente y más substancialmente implicados en influir en la unión del antígeno.

Alternativamente, es posible producir animales transgénicos (*por ejemplo*, ratones) que son capaces, una vez inmunizados, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulinas endógenas. Por ejemplo, se ha descrito que la supresión de los anticuerpos homocigóticos del gen de la región de unión de la cadena pesada (JH) en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal resulta en la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógena. La transferencia de la matriz de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en estos ratones mutantes de línea germinal se traducirá en la producción de anticuerpos humanos bajo la transformación de antígenos. Ver, *por ejemplo*, Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, Year in Immunol., 7:33 (1993), y Duchosal *et al.*, Nature 355:258 (1992). Los anticuerpos humanos también pueden derivarse librerías de visualización de fagos (Hoogenboom *et al.*, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991); Vaughan *et al.*, Nature Biotech 14:309 (1996)).

Los anticuerpos humanos también pueden producirse utilizando diferentes técnicas conocidas en la técnica, incluidas librerías de visualización de fagos (Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581 (1991)). Según esta técnica, los genes de dominio V de anticuerpos son clonados en el marco en un gen de proteína de recubrimiento mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, tal como M 13 o fd, y se muestran como fragmentos de anticuerpo funcionales en la superficie de las partículas del fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN de cadena simple del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también resultan en la selección del gen que codifica el anticuerpo que exhibe esas propiedades. Así, el fago imita alguna de las propiedades de las células B. La visualización de fagos se puede realizar en una variedad de formatos, revisados en, por ejemplo, Johnson, S. y K Chiswell, J. D, Cur Opin Struct Biol. 3:564-571 (1993). Varias fuentes de segmentos de genes V pueden utilizarse para la visualización de fagos. Por ejemplo, Clackson *et al.*, Nature, 352:624-628 (1991) aisló una gama diversa de anticuerpos anti-oxazolona de una pequeña librería combinatoria aleatoria de genes V derivados del bazo de ratones inmunizados. Un repertorio de los genes V de donantes humanos no inmunizados se puede construir y anticuerpos para una amplia gama de antígenos (incluyendo auto-antígenos) pueden aislarse, por ejemplo, siguiendo esencialmente las técnicas descritas por Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991), o Griffith *et al.*, EMBO J. 12:725-734 (1993). Véase, también, las patentes US 5.565.332 y 5.573.905. Las técnicas de Cole *et al.* y Boerner *et al.* también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985) y Boerner *et al.*, J. Immunol., 147 (1):86-95 (1991)). Los anticuerpos humanos también pueden ser generados mediante células B activadas *in vitro* (véase las patentes US 5.567.610 y 5.229.275).

Fragmentos de anticuerpos

Los fragmentos de anticuerpos también están incluidos en la invención. Varias técnicas han sido desarrolladas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos fueron derivados a través de digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, *por ejemplo*, Morimoto *et al.*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992) y Brennan *et al.*, Science, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden producirse ahora directamente por mediante células huésped recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos pueden aislarse de las librerías de anticuerpos fago descritas anteriormente. Alternativamente, fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E. coli* y unirse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, Bio/Technology 10:163-167 (1992)). Según otro enfoque, los fragmentos F(ab')₂ se pueden aislar directamente del cultivo de la célula huésped recombinante. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el experto. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de una sola cadena (scFv). Ver la patente WO 93/16185; patente US 5.571.894 y la patente US 5.587.458. FV y SFV son las únicas especies con de sitios de combinación intactos que carecen de regiones constantes, por lo que son adecuadas para reducir la unión no específica durante el uso *in vivo*. Las proteínas de fusión sFv pueden construirse para producir la fusión de una proteína efectora en cualquiera de los aminoácidos o el terminal carboxilo de una sFV. Ver *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, *supra*. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, tal como se describe en la patente US 5.641.870 por ejemplo. Estos fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

Anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos)

Los anticuerpos de la invención también incluyen, por ejemplo, anticuerpos multiespecíficos, que tienen especificidades de unión de al menos dos antígenos diferentes. Aunque estas moléculas normalmente sólo unen dos antígenos (*es decir*, anticuerpos biespecíficos, BsAbs), los anticuerpos con especificidades adicionales, tales como anticuerpos triespecíficos están incluidos por esta expresión cuando se utiliza aquí. Ejemplos de BsAbs incluyen aquellos con un brazo dirigida contra un antígeno de célula tumoral y el otro brazo dirigido contra una molécula de activación citotóxica tal como anti-FcγRI/anti-CD15, anti-p185^{HER2}/fcγRIII (CD16), célula B anti-CD3/anti-maligna (1D10), anti-CD3/anti-p185^{HER2}, anti-CD3/anti-p97, carcinoma celular anti-CD3/anti-renal, anti-CD3/anti-OVCAR-3, anti-CD3/L-D1 (anti-carcinoma de colon), anti-CD3/anti-melanocito análogo de hormona estimulante, receptor anti-EGF/anti-CD3, anti-CD3/anti-CAMA1, anti-CD3/anti-CD19, anti-CD3/MoV18, molécula de adhesión celular anti-neural (NCAM)/anti-CD3, proteína de unión anti-folato (FBP)/anti-CD3, antígeno asociado a carcinoma anti-pan (CMOZ-31)/anti-CD3; BsAbs con un brazo que se une específicamente a un antígeno tumoral y un brazo que se une a una toxina tal como la anti-saporina/anti-Id-1, anti-CD22/anti-saporina, anti-CD7/anti-saporina, anti-CD38/anti-saporina, anti-CEA/cadena A anti-ricina, anti-interferón-α (IFN-α)/idiotipo anti-hibridoma, anti-CEA/vinca alcaloide; BsAbs para convertir fármacos activados con enzimas tales como fosfatasa anti-CD30/anti-alcalina (que cataliza la conversión de profármaco de fosfato de mitomicina a mitomicina alcohol); BsAbs que puede ser utilizados como agentes fibrinolíticos, tal como activador tisular antifibrina/anti-plasminógeno (tPA), activador del plasminógeno anti-fibrina/tipo anti-uroquinasa (uPA); BsAbs para dirigir complejos inmunes a los receptores de superficie celular, tal como lipoproteína anti-baja densidad (LDL)/receptor anti-Fc (por ejemplo, FcγRI, FcγRII o FcγRIII); BsAbs para su uso en el tratamiento de enfermedades infecciosas tales como virus simple de anti-CD3/anti-herpes (VHS), receptor anti-células T: complejo CD3/anti-influenza, anti-FcγR/anti-HIV; BsAbs para la detección de tumores *in vitro* o *in vivo* tal como anti-CEA/anti-EOTUBE, anti-CEA/y DPTA, anti-p185^{HER2}/anti-hapteno; BsAbs como adyuvantes de vacunas, y BsAbs como herramientas de diagnóstico tales como anti-IgG de conejo/anti-ferritina, anti-peroxidasa de rábano picante (HRP)/anti-hormonales, anti-somatostatina/anti-sustancia P, anti-HRP/anti-FITC, anti-CEA/anti-β-galactosidasa. Ejemplos de anticuerpos triespecíficos incluyen anti-CD3/anti-CD4/anti-CD37, anti-CD3/anti-CD5/anti-CD37 y anti-CD3/anti-CD8/anti-CD37. Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de larga duración o fragmentos de anticuerpos (*por ejemplo*, anticuerpos Biespecíficos F(ab')₂).

Los procedimientos para producir anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basan en la coexpresión de dos pares de cadena pesada y cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen particularidades diferentes (Millstein y col., Nature, 305:537-539 (1983)). Debido a la mezcla aleatoria de cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una concentración potencial de 10 moléculas de anticuerpos distintos, de los cuales sólo uno tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que normalmente se hace por etapas de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa, y los rendimientos de producto son bajos. Procedimientos similares se describen en la patente WO 93/08829, y en Traunecker *et al.*, EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

De acuerdo con una aproximación diferente, los dominios de anticuerpos variables con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se funden con las secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión preferiblemente es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos una parte de las regiones de articulación, CH2 y CH3. Es preferible tener la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADNs que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se co-transfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones cuando relaciones desiguales de las tres cadenas de polipéptidos utilizados en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias

de codificación para dos o las tres cadenas de polipéptidos en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptidos en relaciones iguales resulta en altos rendimientos o cuando las relaciones no son de particular importancia.

5 En una realización de esta aproximación, los anticuerpos biespecíficos se componen de un cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión, en un brazo y un par de cadena ligera y cadena pesada de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se encontró que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de la cadena de combinaciones de inmunoglobulinas no deseadas, tal como la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo la mitad de la
10 molécula biespecífica, que proporciona una manera fácil de separación. Esta aproximación se presenta en el documento WO 94/04690. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

Según otra aproximación descrita en el documento W096/27011, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo
15 pueden ser diseñadas para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo celular recombinante. La interfaz preferida comprende al menos una parte del dominio CH3 de un anticuerpo de dominio constante. En este procedimiento, una o más pequeñas cadenas laterales de los aminoácidos de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo se sustituyen con grandes cadenas laterales (*por ejemplo*, tirosina y triptófano). “Cavidades” compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena lateral de gran tamaño se crean en la interfaz de la molécula del segundo
20 anticuerpo mediante la sustitución de las grandes cadenas laterales de los aminoácidos, con las más pequeñas (*por ejemplo*, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

Técnicas para la generación de anticuerpos biespecíficos de fragmentos de anticuerpos también se han descrito en
25 la literatura. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar usando enlaces químicos. Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que anticuerpos intactos son proteolíticamente troceados para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de arsenito sódico para estabilizar ditioles adyacentes y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados son convertidos a continuación en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab'-TNB se reconvierte
30 a continuación a Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar de los otros derivados Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden utilizarse como agentes para la inmovilización selectiva de las enzimas.

Los avances recientes han facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que pueden unirse
35 químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico completamente humanizada F(ab')₂. Cada fragmento Fab' fue secretó por separado *E. coli* y fue sometido a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado fue capaz de unirse a células que sobreexpresan el receptor VEGF y células T humanas normales, así como activar la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos contra objetivos
40 de tumor de mama humana.

Varias técnicas para la fabricación y el aislamiento de fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente del cultivo de células recombinantes también se han descrito. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos han sido producidos mediante cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148 (5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se enlazaron con las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes
45 mediante fusión de genes. Los homodímeros de anticuerpos se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y luego se volvieron a oxidar para formar los heterodímeros de anticuerpos. Este procedimiento también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología “diacuerpo” descrita por Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. EE.UU.*, 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para hacer fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos constituyen un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) mediante un enlace que es demasiado corto para permitir el enlace entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento se ven obligados a emparejarse con dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando dos sitios de unión con el antígeno. Otra estrategia para hacer fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros de una sola cadena Fv (sFV)
50 también ha sido descrita. Ver Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, anticuerpos triespecíficos se pueden preparar. Tutt *et al.* *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

60 Anticuerpos Heteroconjugados

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o “heteroconjugados”, que son anticuerpos de la invención. Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse a avidina, y el otro a biotina. Estos anticuerpos, por ejemplo, se han propuesto para marcar las células del sistema inmunológico en células no
65 deseadas (patente US 4.676.980), y para el tratamiento de la infección por VIH (patentes WO 91/00360, WO 92/200373, y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden realizarse usando cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Agentes de reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica, y se describe en la patente US 4.676.980, junto con una serie de técnicas de reticulación.

Anticuerpos multivalentes

Los anticuerpos de la invención incluyen un anticuerpo multivalente. Un anticuerpo multivalente puede ser internalizado (y/o catabolizado) más rápido que un anticuerpo bivalente mediante una célula que expresa un antígeno al que se unen los anticuerpos. Los anticuerpos de la invención pueden ser anticuerpos polivalentes (que son distintos de los de la clase IgM) con tres o más puntos de unión del antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que puede ser fácilmente producidos mediante expresión recombinante de ácido nucleico que codifica las cadenas polipeptídicas de los anticuerpos. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más puntos de unión del antígeno. El dominio de dimerización preferido comprende (o se compone de) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo incluirá una región Fc y tres o más sitios de unión del antígeno amino terminal en la región Fc. El anticuerpo multivalente preferido aquí comprende (o se compone de) de tres a ocho aproximadamente, pero preferentemente cuatro, sitios de unión del antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena de polipéptidos (y, preferiblemente, dos cadenas de polipéptidos), donde la cadena de polipéptidos comprende dos o más dominios variables. Por ejemplo, la cadena de polipéptidos podrá comprender VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc, donde VD1 es un dominio de la primera variable, VD2 es un dominio de la segunda variable, Fc es una cadena de polipéptidos de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o polipéptido, y n es 0 ó 1. Por ejemplo, la cadena de polipéptidos puede comprender: VH-CH1-enlace flexible-VH-CH1-cadena región Fc, o VH-CH1-VH-CH1-cadena región Fc. El anticuerpo multivalente aquí preferentemente comprende además al menos dos (y preferiblemente cuatro) polipéptidos de dominio variable de la cadena ligera. El anticuerpo multivalente aquí puede, por ejemplo, incluir de dos a ocho polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos de dominio variable de cadena ligera contemplados aquí comprenden un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, además comprenden un dominio CL.

Ingeniería de la función efectora

Puede ser conveniente modificar el anticuerpo de la invención respecto a la función efectora, para mejorar la eficacia de los anticuerpos en el tratamiento del cáncer, por ejemplo. Por ejemplo, un residuo de cisteína puede ser introducido en la región Fc, lo que permite la formación de puentes intercatenarios de disulfuro en la región. El anticuerpo homodimérico así generado puede haber mejorado la capacidad de internalización y/o el aumento del complemento y la muerte celular mediada por citotoxicidad celular anticuerpo dependiente (ADCC). Ver Caron *et al.*, J. Exp Med 176:1191-1195 (1992) y Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral reforzada también pueden prepararse usando reticuladores heterobifuncionales tal como se describe en Wolff *et al.* Cancer Research 53:2560-2565 (1993). Alternativamente, se puede manipular un anticuerpo que tiene regiones Fc duales y así puede haber mejorado la lisis de complemento y las capacidades de ADCC. Ver Stevenson *et al.* Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989). Para aumentar la vida media en suero de los anticuerpos, se puede incorporar un epítipo de unión a un receptor de rescate en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo), tal como se describe en la patente US 5.739.277, por ejemplo. Tal como se usa aquí, el término "epítipo de unión a un receptor de rescate" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, O IgG₄) que es responsable de aumentar la vida media *in vivo* en suero de la molécula de IgG.

Inmunconjugados

La invención también se refiere a inmunconjugados que comprenden el anticuerpo conjugado aquí descrito en un agente citotóxico, tal como un agente quimioterapéutico, toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, plantas, o animal, o fragmentos de los mismos), o un isótopo radiactivo (*es decir*, un radioconjugado). Una variedad de radionucleidos están disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, por ejemplo, ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y y ¹⁹⁶Re.

Agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de inmunconjugados se han descrito anteriormente. Por ejemplo, BCNU, estreptozaicina, vincristina, 5-fluorouracilo, la familia de los agentes conocidos colectivamente como LL-E33288 compleja descrita en las patentes US 5.053.394, 5.770.710, esperamicinas (patente US 5.877.296), etc. (ver también la definición de agentes quimioterapéuticos aquí) se pueden conjugar a anti-ANGPTL4, anti-alfa Vbeta5 o anticuerpos anti-angiogénesis o fragmentos de los mismos.

Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radiactivo. Una variedad de isótopos radiactivos están disponibles para la producción de anti-ANGPTL4 radioconjugado o anticuerpos anti-angiogénesis o fragmentos de los mismos. Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, por ejemplo, ²¹¹At, ¹³¹I, ¹²⁵I, ⁹⁰Y, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁵³Sm, ²¹²Bi, ³²P, ²¹²Pb, ¹¹¹In, isótopos radiactivos de Lu, etc. Cuando el conjugado se utiliza para el diagnóstico, puede comprender un átomo radiactivo para los estudios de centellografía, por ejemplo, ^{99m}Tc o ¹²³I, o una etiqueta de giro para resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como resonancia magnética de imagen, MRI), tal como yodo-123, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso y hierro.

Las radioetiquetas u otras se pueden incorporar en el conjugado de maneras conocidas. Por ejemplo, el péptido se puede biosintetizar o puede ser sintetizado mediante síntesis química de aminoácidos usando precursores adecuados de los aminoácidos que impliquen, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Etiquetas tales como ^{99m}Tc o ¹²³I, ¹⁸⁸Re y ¹¹¹In se pueden fijar a través de un residuo de cisteína en el péptido. Itrio-90 se puede fijar a través de un residuo de lisina. El procedimiento IODOGEN (Fraker *et al* (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57) puede ser

utilizado para incorporar yodo-123. Véase, por ejemplo, Monoclonal Antibodies in Immunocintigraphy (Chatal, CRC Press 1989), que describe otros procedimientos en detalle.

Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden utilizarse incluyen cadena de difteria A, fragmentos activos no vinculantes de la toxina de la difteria, cadena de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena de ricina, cadena de abrina A, cadena de modeccina A, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de Momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de officinalis sapaonaria, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, neomicina y tricotecenos. Véase, por ejemplo, la patente WO 93/21232 publicada el 28 de octubre de 1993.

Los conjugados del anticuerpo y del agente citotóxico se hacen usando una variedad de agentes de acoplamiento bifuncional de proteínas, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (TI), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCL), ésteres activos (tal como disuccinimidil suberato), aldehídos (como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tal como bis (p-azidobenzoil) hexandiamina), derivados de bis-diazonio (tal como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tal como 2,6-diisocianato de tolieno), y compuestos de flúor bis-activo (tal como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, un inmunotoxina de ricina puede prepararse tal como se describe en Vitetta *et al.* Science 238: 1098 (1987). Ácido triaminepentaacético de 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno (MX-DTPA) etiquetado con carbono-14 es un agente quelante de ejemplo para la conjugación de radionucleótidos al anticuerpo. Ver el documento WO94/11026. El enlace puede ser un “enlace que se puede separar” que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede utilizarse un enlace de ácido lábil, enlace sensible a la peptidasa, enlace fotolábil, enlace o enlace que contiene disulfuro de dimetilo (Chari *et al.*, Cancer Research 52:127-131 (1992); patente US 5.208.020).

Alternativamente, una proteína de fusión que comprende el anticuerpo ANGPTL4, anti- $\alpha_v\beta_5$, o anti-angiogénesis y agente citotóxico puede realizarse, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. La longitud del ADN puede comprender respectivas regiones que codifican las dos partes del conjugado adyacentes entre sí o separadas por una región que codifica un péptido de enlace que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo se conjuga a un “receptor” (estreptavidina de este tipo) para su utilización en el tumor premarcado, en el que el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la eliminación, del conjugado no unido de la circulación usando un agente de limpieza y la administración de un “ligando” (avidina por ejemplo), que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido). En ciertas realizaciones, un inmunconjugado se forma entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una endonucleasa de ADN, tal como una desoxirribonucleasa; DNasa).

Maitansina y maitansinoides

La invención proporciona un anticuerpo de la invención, que se conjuga con una o más moléculas maitansinoides. Los maitansinoides son inhibidores mitotóticos que actúan por inhibición de polimerización de la tubulina. La maitansina fue aislada por primera vez del arbusto de África oriental *Serrata Maytenus* (patente US 3.896.111). Posteriormente se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tal como maitansinol y ésteres C-3 maitansinol (patente US 4.151.042). Maitansinol sintético y derivado y sus análogos se describen, por ejemplo, en las patentes US 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663 y 4.371.533.

El anticuerpo anti-ANGPTLA, anti- $\alpha_v\beta_5$ o anti-angiogénesis se conjuga con una molécula de maitansinoide sin disminuir de manera significativa la actividad biológica de cualquiera de los anticuerpos o la molécula de maitansinoide. Un promedio de 3-4 moléculas anticuerpos maitansinoides conjugados mediante molécula ha demostrado ser eficaces en la mejora de la citotoxicidad de las células diana sin afectar negativamente a la función o la solubilidad de los anticuerpos, aunque incluso una molécula de toxina/anticuerpo se esperaría que mejorara la citotoxicidad sobre el uso de anticuerpo desnudo. Los maitansinoides son bien conocidos en la técnica y pueden ser sintetizados mediante técnicas conocidas o aisladas de fuentes naturales. Maitansinoides adecuados se describen, por ejemplo, en la patente US 5.208.020 y en las patentes y otras publicaciones que no son patentes indicadas anteriormente. En una realización, los maitansinoides son maitansinol y análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, tal como varios ésteres de maitansinol.

Hay muchos grupos de enlace conocidos en la técnica de hacer conjugados de anticuerpos maitansinoides, incluyendo, por ejemplo, los descritos en la patente US 5.208.020 o en la patente EP 0 425 235 B1, y Chari *et al.*, Cancer Research 52:127-131 (1992). Los grupos de enlace incluyen grupos de disulfuro, grupos tioéter, grupos de ácido lábil, grupos fotolábiles, grupos lábiles de peptidasa o grupos lábiles de esterasa, tal como se describe en las patentes anteriormente identificadas, prefiriéndose grupos de disulfuro y tioéter.

Los conjugados del anticuerpo y maitansinoide puede hacerse utilizando una variedad de agentes de acoplamiento bifuncional de proteínas, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato de metilo, iminotiolano (TI), derivados bifuncionales de imidoésteres (tal como dimetil adipimidato HCL), ésteres activos (tal como disuccinimidil suberato), aldehídos (tal como glutaraldehído),

compuestos bis-azido (tal como bis (p-azidobenzoil) hexandiamina), derivados de bis-diazonio (tal como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tal como 2,6-diisocianato de tolueno), y el compuestos de flúor bis-activos (tal como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Agentes de acoplamiento típicos incluyen N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP) (Carlsson *et al.*, Biochem J. 173:723-737 [1978]) y N-succinimidil-4-(2-piridiltio) pentanoato (SPP) para establecer un enlace disulfuro.

El enlace puede asociarse a la molécula maitansinoide en diversas posiciones, dependiendo del tipo de enlace. Por ejemplo, un enlace éster se forma mediante reacción con un grupo hidroxilo con técnicas de acoplamiento convencionales. La reacción puede producirse en la posición C-3, que tienen un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetil, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo, y la posición C-20 con un grupo hidroxilo. El enlace se forma en la posición C-3 de maitansinol o un análogo de maitansinol.

Caliqueamicina

Otro inmunoconjugado de interés comprende un anticuerpo de la invención, conjugado con una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de caliqueamicina de antibióticos es capaz de producir roturas de doble cadena de ADN en concentraciones sub-picomolares. Para la preparación de los conjugados de la familia caliqueamicina, véase las patentes USA 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, 5.877.296 (todas de American Cyanamid Company). Análogos estructurales de caliqueamicina que pueden ser utilizados incluyen, pero no están limitados a, γ_1^1 , α_2^1 , A_3^1 , N-acetil- γ_1^1 , PSAG y θ_1^1 (Hinman *et al.*, Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode *et al.*, Cancer Research 58:2925-2928 (1998) y las patentes estadounidenses antes mencionadas para American Cyanamid). Otro medicamento contra tumores que el anticuerpo puede conjugar es QFA, que es un antifolato. Ambos, caliqueamicina y QFA, tienen sitios intracelulares de acción y no atraviesan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes a través de la internalización mediada por anticuerpos mejora enormemente sus efectos citotóxicos.

Otras modificaciones de anticuerpos

Otras modificaciones del anticuerpo se contemplan aquí. Por ejemplo, el anticuerpo puede estar enlazado a uno de una variedad de polímeros noproteínicos, por ejemplo, polietileno glicol, polipropileno glicol, polioxialquilenos, o copolímeros de polietileno glicol y polipropileno glicol. El anticuerpo también puede ser atrapado en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o por polimerización interfacial (por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente), en los sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas, o en macroemulsiones). Estas técnicas se consignan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Oslo, A., Ed., (1980).

Liposomas y nanopartículas

Los polipéptidos de la invención pueden formularse en liposomas. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención pueden formularse como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen los anticuerpos se preparan mediante procedimientos ya conocidos en la técnica, tal como se describe en Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 82:3688 (1985); Hwang *et al.*, Proc. Natl Acad Sci. EE.UU., 77:4030 (1980), y las patentes US 4.485.045 y 4.544.545. Los liposomas con mayor tiempo de circulación se consignan en la patente US 5.013.556. En general, la formulación y el uso de liposomas es conocida para los expertos en la materia.

Particularmente útil liposomas pueden ser generados por el procedimiento inverso fase de evaporación con una composición que comprende la fosfatidilcolina de lípidos, colesterol y PEG-derivatizada fosfatidiletanolamina (PEG-PE). Los liposomas son extruido a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Fab' fragments del anticuerpo de la invención puede ser conjucted a los liposomas como se describe en la Martin *et al* J. Biol. Chem.. 257: 286-288 (1982) A través de una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente de quimioterapia (como la doxorubicina) es opcional, que figura en el liposoma. Ver Gabizon *et al.* J. National Cancer Inst.81 (19) 1484 (1989).

Otros usos

Los anticuerpos de la invención tienen varias utilidades. Por ejemplo, los anticuerpos anti-ANGPTL4 pueden ser utilizados en pruebas de diagnóstico para ANGPTL4, por ejemplo, la detección de su expresión en células específicas, tejidos o suero, para la detección de cáncer (por ejemplo, en la detección de cáncer renal), etc. En una realización, los anticuerpos ANGPTL4 se utilizan para la selección de la población de pacientes para el tratamiento con los procedimientos aquí previstos, por ejemplo, para pacientes con expresión de ANGPTL4, niveles elevados de ANGPTL4, o cánceres sensibles a niveles de ANGPTL4. Diversas técnicas de ensayo de diagnóstico conocidas en la técnica pueden utilizarse, tal como ensayos de unión competitiva, ensayos de sándwich, directos o indirectos y ensayos de inmunoprecipitación realizados en cualquiera de las fases homogénea o heterogénea (Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc. (1987) pp. 147-158). Los anticuerpos utilizados en los ensayos de diagnóstico pueden ser etiquetados con una molécula detectable. La fracción detectable debe ser capaz de producir, ya sea directa o indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, la fracción detectable puede ser un radioisótopo, tal como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , o ^{125}I , un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina,

o luciferina, o una enzima, tal como fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o peroxidasa de rábano picante. Cualquier procedimiento conocido en la técnica de conjugación de anticuerpos a la fracción detectable puede utilizarse, incluidos los procedimientos descritos por Hunter *et al.*, Nature, 144:945 (1962); David *et al.*, Biochemistry, 13:1014 (1974); Pain *et al.*, J. Immunol. Meth., 40:219 (1981), y Nygren, J. Histochem. y Cytochem., 30:407 (1982).

Los anticuerpos anti-ANGPTL4 también son útiles para la purificación de la afinidad de ANGPTL4 o fragmentos de ANGPTL4 de cultivo celular recombinante o de fuentes naturales. En este proceso, los anticuerpos contra ANGPTL4 se inmovilizan en un soporte adecuado, tal como una resina Sephadex o filtro de papel, utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica. El anticuerpo inmovilizado entonces se pone en contacto con una muestra que contiene el ANGPTL4 a purificar y, posteriormente, el soporte se lava con un disolvente adecuado que elimine sustancialmente todo el material en la muestra, excepto el ANGPTL4, que está unido al anticuerpo inmovilizado. Por último, el soporte se lava con otro disolvente adecuado, que liberará el ANGPTL4 del anticuerpo:

Modificaciones covalentes de polipéptidos de la invención

Las modificaciones covalentes de un polipéptido de la invención, por ejemplo, un fragmento de antagonista de polipéptido, una molécula de fusión (por ejemplo, una molécula de inmunofusión), un anticuerpo de la invención, se incluyen dentro del ámbito de aplicación de la presente invención. Pueden hacerse por síntesis química o por separación enzimática o química del polipéptido, si procede. Otros tipos de modificaciones covalentes del polipéptido se introducen en la molécula mediante la reacción de los residuos de aminoácidos específicos del polipéptido con un agente de derivación orgánica que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o con residuos N- o C-terminal, o mediante la incorporación de un aminoácido modificado o un aminoácido no natural en la cadena creciente del polipéptido, por ejemplo, Ellman *et al.* Meth. Enzym. 202:301-336 (1991); Noren *et al.* Science 244:182 (1989), y & publicaciones de solicitudes de patentes US 20030108885 y 20030082575.

Los residuos de cisteinilo más comúnmente se hacen reaccionar con un haloacetatos (y aminos correspondientes), tales como ácido cloroacético o cloroacetamida, para dar carboximetil o derivados de carboxiamidometil. Los residuos de cisteinilo también son derivatizados mediante reacción con bromotrifluoroacetona, α -bromo- β -(5-imidozoi)l de ácido propiónico, fosfato cloroacetilo, N-alquilmaleimidias, 3-nitro-2-piridil disulfuro, metil-2-piridil disulfuro, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol, o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.

Los residuos de histidina se derivatizan mediante reacción con dietilpirocarbonato con un pH de 5,5-7,0 porque este agente es relativamente específico para la cadena lateral de histidina. Bromuro de para-bromofenacilo también es útil; la reacción se realiza típicamente en cacodilato de sodio 0,1 M a pH 6,0.

Los residuos de sisinilo y amino-terminales reaccionan con anhídridos de ácido succínico o carboxílico. La derivatización con estos agentes tiene el efecto de invertir la carga de los residuos de lisinilo. Otros reactivos adecuados para la derivación de residuos que contienen α -amino incluyen imidoésteres tales como metil picolinimide, piridoxal fosfato, piridoxal cloroborohidruro, ácido trinitrobenzenesulfónico, O-metilisourea, 2,4-pentanodiona, y reacción catalizada con transaminasas de glioxilato.

Los residuos de arginil son modificados mediante reacción con uno o varios reactivos convencionales, entre ellos fenilgloxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona, y ninhidrina. La derivatización de los residuos de arginina requiere que la reacción se realice en condiciones alcalinas debido a la alta pK_a del grupo funcional de guanidina. Por otra parte, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina, así como el grupo épsilon-amino de arginina.

La modificación específica de residuos de tirosilo se puede realizar, con especial interés en la introducción de etiquetas espectrales en los residuos de tirosilo mediante reacción con los compuestos de diazonio aromático o tetranitrometano. Más comúnmente, N-acetilimidazol y tetranitrometano se utilizan para formar especies de O-acetil tirosilo y derivados 3-nitro, respectivamente. Los residuos de tirosilo son yodados utilizando ^{125}I o ^{131}I para la preparación de proteínas etiquetadas para su uso en radioinmunoensayos.

Los grupos laterales de carboxilo (aspartil o glutamil) son selectivamente modificados mediante reacción con carbodiimidas ($R-N=C=N-R'$), donde R y R' son diferentes grupos alquilo, tal como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etil) carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil) carbodiimida. Además, los residuos de glutamil y aspartil se convierten en residuos de asparaginil y glutaminil mediante reacción con los iones de amonio.

Los residuos de glutaminil y asparaginil frecuentemente se desamidán a los correspondientes residuos de glutamil y aspartil, respectivamente. Estos residuos se desamidán en condiciones neutras o básicas. La forma desamidada de estos residuos se inscribe en el ámbito de aplicación de la presente invención.

Otras modificaciones incluyen la hidroxilación de la prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serilo o treonilo, la metilación de los grupos α -amino de lisina, arginina, y cadenas laterales de histidina (T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), acetilación de amina N terminal, y amidación de cualquier grupo carboxilo C terminal.

Otro tipo de modificación covalente implica el acoplamiento de manera química o enzimática de glucósidos en un polipéptido de la invención. Estos procedimientos tienen la ventaja de que no requieren la producción del polipéptido

en una célula huésped que tiene capacidades de glicosilación de la glicosilación ligada a N- u O-. Dependiendo del modo de acoplamiento utilizado, el azúcar(es) pueden asociarse a (a) arginina e histidina, (b) grupos libres de carboxilo, (c) grupos libres de sulfhidrilo, tal como los de cisteína, (d) grupos libres de hidroxilo, tales como los de la serina, treonina, o hidroxiprolina, (e) residuos aromáticos, como los de la fenilalanina, tirosina y triptófano, o (f) el grupo amida de glutamina. Estos procedimientos se describen en el documento WO 87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, CRC Crit. Biochem., Pp. 259-306 (1981).

La eliminación de cualquier fracción de carbohidratos presente en un polipéptido de la invención puede realizarse química o enzimáticamente. La deglicosilación química requiere la exposición del polipéptido al compuesto de ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto similar. Este tratamiento resulta en la ruptura de la mayoría o la totalidad de los azúcares, excepto el azúcar de enlace (N-acetilglucosamina o N-acetilglucosamina), dejando el polipéptido intacto. La deglicosilación química se describe por Hakimuddin, *et al* Arch Biochem. Biophys. 259:52 (1987) y por Edge *et al*. Anal. Biochem., 118:131 (1981). La digestión enzimática de las fracciones de hidratos de carbono, por ejemplo, en los anticuerpos, se puede lograr mediante el uso de una variedad de endo- y exo-glucosidasas tal como se describe en Thotakura *et al*. Meth. Enzymol. 138:350 (1987).

Otro tipo de modificación covalente de un polipéptido de la invención comprende enlazar el polipéptido a uno de una variedad de polímeros no proteínicos, por ejemplo, polietileno glicol, polipropileno glicol, o polioxialquilenos, de la manera establecida en las patentes US 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 ó 4.179.337.

Vectores, células huésped y procedimientos recombinantes

Los polipéptidos de la invención se pueden producir de manera recombinante, utilizando técnicas y materiales fácilmente obtenibles.

Para la producción recombinante de un polipéptido de la invención, por ejemplo, un ANGPTL4 o un anticuerpo anti-ANGPTL4, un anticuerpo anti- $\alpha\beta_5$ o anticuerpo anti-angiogénesis, por ejemplo, anticuerpo anti-VEGF, el ácido nucleico que lo codifica se aísla y se inserta en un vector replicable para la clonación adicional (amplificación del ADN) o para expresión. El ADN que codifica el polipéptido de la invención es fácilmente aislado y secuenciado usando procedimientos convencionales. Por ejemplo, un ADN que codifica un anticuerpo monoclonal se aísla y secuencia, por ejemplo, mediante el uso de sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo. Muchos vectores están disponibles. Los componentes del vector generalmente incluyen, pero no están limitados a uno o más de los siguientes: una secuencia de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de transcripción.

Componente de secuencia de señal

Los polipéptidos de la invención pueden producirse de manera recombinante no sólo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es típicamente una secuencia de señal u otro polipéptido que tiene un sitio de separación específico en el N-terminal de la proteína madura o polipéptido. La secuencia de señal heteróloga seleccionada típicamente es la que se reconoce y procesa (*es decir*, separada mediante la peptidasa de señal) mediante la célula huésped. Para las células huésped procariotas que no reconocen y procesan la secuencia de señal del polipéptido nativo, la secuencia de señal es sustituido por una secuencia de señal procariota seleccionada, *por ejemplo*, del grupo de fosfatasa alcalina, penicilinas, Ipp, o líderes II de enterotoxina estable. Para la secreción de levadura, la secuencia de señal nativa puede sustituirse mediante, *por ejemplo*, el líder de invertasa de levadura, un líder de factor (incluyendo líderes de factor α *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*), o el líder de fosfatasa ácida, el líder de glucoamilasa de *C. albicans*, o la señal descrita en WO 90/13646. En la expresión de células de mamíferos están disponibles secuencias de señal de mamíferos, así como líderes de secreción viral, por ejemplo, la señal de herpes simple gD.

El ADN de esta región precursora está ligada en el marco de lectura de ADN que codifica el polipéptido de la invención.

Origen del componente de replicación

Los vectores de expresión y de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite que el vector replique una o más células huésped seleccionadas. En general, en la clonación de vectores esta secuencia es la que permite que el vector se replique independientemente del ADN cromosómico huésped, e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación autónomas. Estas secuencias son bien conocidas para una variedad de bacterias, levaduras y virus. El origen de la replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de bacterias Gram-negativas, el origen de plásmido 2 μ es adecuado para levadura y diversos orígenes virales (SV40, poliovirus, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para los vectores de clonación en células de mamíferos. En general, el origen de los componentes de replicación no es necesario para vectores de expresión de mamíferos (el origen de SV40 típicamente sólo se podrá utilizar porque contiene el promotor temprano).

Componente de selección de genes

Los vectores de expresión y de clonación pueden contener un gen de selección, también llamado un marcador seleccionable. La selección de los genes que codifican proteínas atípicas (a) confieren resistencia a los antibióticos u otras sustancias tóxicas, *por ejemplo*, ampicilina, neomicina, metotrexato, o tetraciclina, (b) complementan las deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles en el medio complejo, *por ejemplo*, el gen que codifica D-alanina racemasa para *Bacilli*.

Un ejemplo de un sistema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula huésped. Las células que se transformaron con éxito con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a los medicamentos y, por lo tanto, sobreviven al régimen de selección. Ejemplos de esta selección dominante usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico y higromicina.

Otro ejemplo de marcadores adecuados seleccionables para las células de mamíferos son los que permiten la identificación de las células competentes para conocer el ácido nucleico del anticuerpo, como DHFR, timidina quinasa, metalotioneína I y II, típicamente genes de metalotioneína de primates, adenosina deaminasa, ornitindescarboxilasa, *etc.*

Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección DHFR se identificaron por primera vez mediante el cultivo de todos los transformantes en medio de cultivo que contiene metotrexato (MTX), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula huésped apropiada cuando se emplea medio DHFR de tipo salvaje es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en actividad DHFR.

Alternativamente, las células huésped (en particular, huéspedes de tipo salvaje que contienen DHFR endógena) transformadas o co-transformadas con secuencias de ADN que codifican un polipéptido de la invención, proteína DHFR de tipo salvaje y otro marcador seleccionable, tal como aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH) puede seleccionarse mediante crecimiento celular en un medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable, tal como un antibiótico aminoglicosídico, *por ejemplo*, kanamicina, neomicina, o G418. Ver la patente US 4.965.199.

Un gen de selección adecuado para su uso en la levadura es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura Yrp7 (Stinchcomb *et al.*, Nature, 282:39 (1979)). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección de una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC N° 44076 o PEP4-1. Jones, Genetics, 85:12 (1977). La presencia de lesión *trp1* I en el genoma de la levadura de la célula huésped proporciona entonces un entorno eficaz para la detección de la transformación mediante crecimiento en ausencia de triptófano. De manera similar, cepas de levadura deficientes en Leu2 (ATCC 20622 ó 38626) se complementan mediante plásmidos conocidos que llevan el gen Leu2.

Además, los vectores derivados de plásmido circular pKD1 de 1,6 μ m pueden ser utilizados para la transformación de levaduras de *Kluyveromyces*. Alternativamente, se informó de un sistema de expresión de producción a gran escala de quimosina de ternero recombinante para *K. lactis*, Van den Berg, Biol/Technology, 8:135 (1990). También se han descrito vectores de expresión de múltiples copias estables para la secreción de albúmina de suero humana recombinante madura mediante cepas industriales de *Kluyveromyces*. Fleer *et al.*, Bio/Technology, 9:968-975 (1991).

Componente promotor

Los vectores de expresión y clonación usualmente contienen un promotor que es reconocido por el organismo huésped y se une operativamente a un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención. Promotores adecuados para su uso con huéspedes procarióticos incluyen el promotor *phoA*, sistemas promotores de β -lactamasa y lactosa, fosfatasa alcalina, sistema de promotor de triptófano (TRP), y promotores híbridos tal como el promotor tac. Sin embargo, otros promotores bacterianos conocidos son adecuados. Promotores para su uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia Shine-Dalgarno (SD) unida operativamente al ADN que codifica el polipéptido de la invención.

Las secuencias promotoras son conocidos para eucariotas. Prácticamente todos los genes eucarióticos tienen una región rica en AT situada 25 a 30 bases antes del sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada 70 a 80 bases antes desde el inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de los genes más eucarióticos hay una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola poli A al extremo 3' de la secuencia de codificación. Todas estas secuencias están debidamente insertadas en vectores de expresión eucarióticos.

Ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para su uso con huéspedes de levadura incluyen los promotores para 3-fosfoglicerato quinasa, u otras enzimas glucolíticas, como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, decarboxilasa piruvato, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa, y glucoquinasa.

Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles con la ventaja adicional de la transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras de alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas de degradación asociadas con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-

3-fosfato deshidrogenasa, y las enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Vectores y promotores adecuados usados en la expresión de la levadura describen más detalladamente en la patente EP 73.657. Los potenciadores de levadura también se utilizan ventajosamente con los promotores de levadura.

- 5 La transcripción de polipéptidos de la invención de vectores en las células huésped de mamíferos se controla, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de los genomas de virus tales como el virus de polio, el virus de la viruela aviar, adenovirus (como adenovirus 2), el virus del papiloma bovino, el virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y típicamente virus del simio 40 (SV40), de promotores heterólogos de mamíferos, *por ejemplo*, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico, siempre que
10 los promotores sean compatibles con los sistemas de la célula huésped.

- Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción SV40 que también contiene el origen viral SV40 de replicación. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción HindIII E. Un sistema para la
15 expresión de ADN en huéspedes mamíferos usando el virus del papiloma bovino como vector se describe en la patente US 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la patente US 4.601.978. Ver también Reyes *et al.*, Nature 297:598-601 (1982) sobre la expresión de ADN β -interferón humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina quinasa de virus de herpes simple. Alternativamente, la repetición de terminal largo del virus del sarcoma de rous puede ser utilizada como promotor.

20 *Componente potenciadores de elementos*

- La transcripción de ADN que codifica un polipéptido de la presente invención mediante eucariotas superiores aumenta a menudo por la inserción de una secuencia potenciadora en el vector. Muchas secuencias potenciadoras
25 son ahora conocidas de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína, e insulina). Típicamente, uno utilizará un potenciador de un virus de célula eucariota. Los ejemplos incluyen el potenciador SV40 en el lado tardío del origen de replicación (100-270 pb), el citomegalovirus estimulador del promotor temprano, el potenciador de polio en la parte tardía del origen de replicación, y potenciadores de adenovirus. Ver también Yaniv, Nature 297:17-18 (1982) sobre la mejora de los elementos para la activación de promotores eucarióticos. El potenciador se
30 puede empalmar en el vector en una posición 5' ó 3' en la secuencia de codificación del polipéptido, pero normalmente se encuentra en un sitio 5' del promotor.

Componente de terminación de la transcripción

- 35 Los vectores de expresión utilizados en las células huésped eucarióticas (levaduras, hongos, insectos, plantas, células animales, humanas o nucleadas de otros organismos pluricelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y la estabilización del ARNm. Estas secuencias están comúnmente disponibles en las regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente 3', de ADN eucariótico o viral o ADNc. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica
40 el polipéptido de la invención. Un componente de terminación de transcripción útil es la región de poliadenilación de hormona bovina del crecimiento. Ver WO94/11026 y el vector de expresión ahí descrito.

Selección y transformación de células huésped

- 45 Las células huésped adecuadas para la clonación o expresión de ADN que codifica los polipéptidos de la invención en los vectores aquí son las células procariotas, levadura, o eucariotas mayores descritas anteriormente. Procariotas adecuados para este propósito incluyen eubacterias, tales como bacterias Gram-negativas o Gram-positivas, por ejemplo, enterobacterias, como *Coli*, *por ejemplo*, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *por ejemplo*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, *por ejemplo*, *Serratia marcesans*, y *Shigella*, así como *Bacilos* como
50 *B. subtilis* y *B. licheniformis* (*por ejemplo*, *B. licheniformis* 41P descrita en DD 266710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Típicamente, el huésped *E. coli* de clonación es *E. coli* 294 (ATCC 31446), aunque otras cepas como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31537), y *E. coli* W3110 (ATCC 27325) son adecuadas. Estos ejemplos son ilustrativos y no limitativos.

- 55 Además de las células procariotas, microorganismos eucarióticos como los hongos filamentosos y levaduras son huéspedes de clonación o expresión adecuados para el polipéptido de la invención-vectores de codificación. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadero común, es el más utilizado entre los microorganismos huésped eucarióticos inferiores. Sin embargo, una pluralidad de otros géneros, especies y cepas están comúnmente disponibles y son útiles aquí, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; huéspedes *Kluyveromyces*, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis*, (ATCC 12424), *Bulgaricus K.* (ATCC 16045), *K. wickerhamii* (ATCC 24178), *K. waltii* (ATCC 56500), *K. drosophilorum* (ATCC 36906), *K. thermotolerans*, y *K. Marxianus*; *yarrowia* (PE 402.226); *Pichia pastoris* (PE 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (PE 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos, como, *por ejemplo*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y huéspedes *Aspergillus* como *A. nidulans* y *A. niger*.
60

Las células huésped adecuadas para la expresión de polipéptidos glicosilados de la invención son derivadas de organismos multicelulares. Ejemplos de las células de invertebrados son células de plantas y de insectos. Numerosas cepas baculovirales y variantes y correspondientes células huésped de insectos permisivas de huéspedes, como *Spo-*

5 *doptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori* han sido identificados. Una gran variedad de cepas de virus para la transfección están disponibles al público, por ejemplo, la variante L-1 de Autographa californica NPV y la cepa Bm-5 de Bombyx mori NPV, y virus como pueden utilizarse como el virus aquí de acuerdo con la invención, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. Cultivos de células de plantas de algodón, maíz, papa, soya, petunia, tomate y tabaco también puede ser utilizados como huéspedes.

10 Sin embargo, el interés ha sido mayor en células de vertebrados, y la propagación de las células de vertebrados en el cultivo (cultivo de tejidos) se ha convertido en un procedimiento de rutina. Ejemplos de las líneas celulares huéspedes útiles de mamíferos son línea de riñón de mono CV1 transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651), línea de riñón de embriones humanos (293 ó 293 células subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, J. Gen Virol 36:59 (1977)); células renales de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10), células de ovario de hámster chino/DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, Proc. Natl Acad. Sci. EE.UU. 77:4216 (1980)); células de ratón sertoli (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587), células de carcinoma cervical humano (HeLa, ATCC CCL 2), células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células del hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442), células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, Annals N. Y. Acad. 383:44-68 (1982)); células MRC 5, células FS4, y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

20 Las células huésped se transforman con la expresión antes descrita o con vectores de clonación para el polipéptido de la invención, la producción y el cultivo en medios de cultivo convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionando transformantes, o amplificando los genes que codifican las secuencias deseadas.

25 *Cultivo de células huésped*

Las células huésped utilizadas para producir polipéptidos de la invención pueden cultivarse en una variedad de medios. Medios comercialmente disponibles, tales como Ham F10 (Sigma), Minimal Essential Medium (MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Sigma son adecuados para el cultivo de células huésped. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham *et al.*, Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes *et al.*, Anal. Biochem. 102:255 (1980), patentes US 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655O 5.122.469.; WO 90/03430; WO 87/00195; o patente US 30.985 pueden utilizarse como medio de cultivo para células huésped. Cualquiera de estos medios se puede suplementar cuando sea necesario con hormonas y/o otros factores de crecimiento (como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (como HEPES), nucleótidos (como adenosina y timidina), antibióticos (tal como, fármaco 47 gentamicinaTM), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos que suelen estar presentes en una concentración final en el intervalo micromolar), y glucosa o fuente de energía equivalente. Otros suplementos necesarios también pueden incluirse en las concentraciones adecuadas que serían conocidas por los técnicos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH, etc., son las utilizadas anteriormente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y será evidente para el experto en la materia.

Purificación de Polipéptidos

45 Cuando se utilizan técnicas recombinantes, se pueden producir intracelularmente un polipéptido de la invención, por ejemplo, ANGPTL4, anticuerpos de la invención, por ejemplo, anticuerpos anti-ANGPTL4, anticuerpos anti- $\alpha_v\beta_3$ o anticuerpos anti-molécula de angiogénesis, en el espacio periplásmico, o directamente secretado en el medio. Los polipéptidos de la invención pueden recuperarse de un medio de cultivo o de lisatos de la célula huésped. Si están unidos a la membrana, se pueden liberar de la membrana con una solución detergente adecuada (por ejemplo, Triton X-100) o por separación enzimática. Las células empleadas en la expresión de un polipéptido de la invención pueden alterarse por diversos medios físicos o químicos, como ciclos congelación-descongelación, sonicación, disrupción mecánica, o agentes de lisado celular.

Se puede desear purificar un polipéptido de la invención a partir de proteínas de células recombinantes o polipéptidos. Los siguientes procedimientos son ejemplos de procedimientos de purificación adecuados: por fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC, cromatografía de sílice, cromatografía de heparina SepharoseTM, cromatografía en una resina de intercambio aniónico o catiónico (como una columna de ácido poliaspártico, DEAE, etc.); cromatofocalización, SDS-PAGE, precipitación de sulfato de amonio, filtración en gel utilizando, por ejemplo, Sephadex G-75, columnas de proteína A Sepharose para eliminar los contaminantes, tales como IgG, y columnas de metal quelante que se unen a formar marcadas como epítipo de polipéptidos de la invención. Varios procedimientos de purificación de proteínas pueden ser empleados, y tales procedimientos son conocidos en la técnica y se describen por ejemplo en Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, Nueva York (1982). La(s) etapa(s) de purificación seleccionada(s) dependerá(n), por ejemplo, de la naturaleza del proceso de producción utilizado y del polipéptido particular de la invención producido.

65 Por ejemplo, una composición de anticuerpos preparada a partir de las células puede ser purificada mediante, por ejemplo, cromatografía de hidroxipatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación típica. La adecuación de la proteína A como ligando de afinidad

depende de la especie y del isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que está presente en el anticuerpo. Una proteína puede ser utilizada para purificar los anticuerpos que se basan en cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$, o $\gamma 4$ humanas (Lindmark *et al.*, J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). Proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humano (Guss *et al.*, EMBO J. 5:15071575 (1986)). La matriz a la que el ligando de afinidad se fija con mayor frecuencia es agarosa, pero otras matrices están disponibles. Matrices mecánicamente estables tal como vidrio de poro controlado o poli(estirenedivinil)benceno permiten índices de flujo más rápidos y menores tiempos de procesamiento que los que se pueden lograr con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C_{H3} , la resina Bakerbond ABX™ (JT Baker, Phillipsburg, Nueva Jersey) es útil para la purificación. Otras técnicas de purificación de proteínas, por ejemplo, las antes señaladas, también están disponibles en función de los anticuerpos que deben recuperarse. Véase también, Carter *et al.*, Bio/Technology 10:163-167 (1992), que describe un procedimiento para aislar los anticuerpos que son secretados al espacio periplásmico de *E. coli*.

Composiciones farmacéuticas

Formulaciones terapéuticas de polipéptidos de la invención, moléculas de la invención, y combinaciones de las mismos aquí descritas utilizadas de acuerdo con la invención se preparan para su almacenamiento mediante la mezcla de un polipéptido(s) con el grado de pureza deseado con opción de portadores excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables, (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. ed. [1980]), en forma de preparados liofilizados o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes, o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los recipientes en las dosis y las concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos, antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina, conservantes (como cloruro de amonio octadecildimetilbencilo, cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, alcohol fenol, butilo o bencilo; parabenos alquilo tales como metil o propilparabeno, catecol, resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol, y m-cresol), polipéptidos de bajo peso molecular (menor de 10 residuos); proteínas, tal como albúmina, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos como polivinilpirrolidona, aminoácidos como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, lisina o, monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos como glucosa, manosa, o dextrina; agentes quelantes, como EDTA, azúcares como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol, contra-iones formadores de sales como sodio, complejos metálicos (*por ejemplo* complejos Zn-proteínas), y/o surfactantes no iónicos como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

Los ingredientes activos también pueden ser atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente, en los sistemas de suministro de fármacos coloidal (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Estas técnicas se consignan en Remington's Pharmaceutical Science 16ª edición, Osol, A. ed. (1980).

Las formulaciones que se utilizarán para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Se puede preparar preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de las preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen un polipéptido de la invención, cuyas matrices son en forma de artículos conformados, *por ejemplo* películas, o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida son poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (patente US 3.773.919), Los copolímeros de ácido L-glutámico y etil γ -L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido glicólico y ácido láctico degradable, tal como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato leuprólido), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Aunque polímeros como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de las moléculas de más de 100 días, algunos hidrogeles liberan proteínas para períodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un largo tiempo, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, resultando en una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden diseñar estrategias racionales para la estabilización en función del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación intermolecular forma uniones S-S intermoleculares través de intercambio de tio-disulfuro, la estabilización puede lograrse mediante la modificación de residuos de sulfhidrilo, la liofilización de soluciones ácidas, el control de contenido de humedad, utilizando aditivos apropiados, y desarrollando composiciones de matriz de polímero específico. Véase también, *por ejemplo*, la patente US 6.699.501, que describe cápsulas con cobertura de polielectrolito.

También se contempla que un agente de la invención (ANGPTL4, agonista de ANGPTL4 o antagonista de ANGPTL4) puede ser introducido a un sujeto mediante terapia génica. La terapia génica se refiere al tratamiento realizado por la administración de un ácido nucleico a un sujeto. En las aplicaciones de la terapia génica, los genes se introducen en las células para lograr síntesis *in vivo* de un producto genético terapéuticamente efectivo, por ejemplo para la sustitución de un gen defectuoso. La "terapia génica" incluye tanto la terapia génica convencional cuando se logra un efecto duradero en una sola vez, como la administración de agentes terapéuticos génicos, lo que implica la administración única o repetida de ADN o ARNm terapéuticamente efectivo. Pueden utilizarse ARN y ADN antisentido como agentes terapéuticos para el bloqueo de la expresión de ciertos genes *in vivo*. Ver, por ejemplo, Ad-ANGPTL4-SiARN aquí descrito. Ya se ha demostrado que oligonucleótidos antisentido cortos pueden ser importados en las células donde actúan como inhibidores, a pesar de sus bajas concentraciones intracelulares causadas por la absorción limitada por la membrana celular. (Zamecnik *et al.*, Proc. Natl. Acad. USA 83:4143-4146 (1986)). Los oligonucleótidos pueden

ser modificados para mejorar su captación, por ejemplo, mediante la sustitución de sus grupos fosfodiéster con carga negativa por parte de grupos sin carga. Para comentarios generales de los procedimientos de terapia génica, véase, por ejemplo, Goldspiel *et al.* Clinical Pharmacy 12:488-505 (1993); Wu y Wu Biotherapy 3:87-95 (1991); Tolstoshev Ann.Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596 (1993); Mulligan Science 260:926-932 (1993); Morgan y Anderson 5 Ann Rev. Biochem. 62:191-217 (1993), y Mayo TIBTECH 11:155-215 (1993). Los procedimientos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante que se pueden utilizar se describen en Ausubel *et al.* eds. (1993) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NYY Kriegler (1990) Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY.

10 Hay una variedad de técnicas disponibles para la introducción de ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si el ácido nucleico se transfiere a las células cultivadas *in vitro* o *in vivo* en las células del huésped previsto. Técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico en células de mamíferos *in vitro* incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano, el procedimiento de precipitación de fosfato de calcio, etc. Los actualmente preferidos en las técnicas de transferencia génica *in vivo* incluyen 15 transfección con vectores virales (típicamente antirretrovirales) y transfección mediada por proteína-liposoma de recubrimiento viral (Dzau *et al.*, Trends in Biotechnology 11, 205-210 (1993)). Por ejemplo, las técnicas de transferencia de ácido nucleico *in vivo* incluyen la transfección de vectores virales (por ejemplo, adenovirus, virus del herpes simple I, lentivirus, retrovirus, o virus adeno-asociados) y los sistemas basados en lípidos (lípidos útiles para la transferencia de lípidos, mediada por el gen son DOTMA, DOPE y DC-Chol, por ejemplo). Ejemplos del uso de vectores 20 virales en terapia génica se puede encontrar en Clowes *et al.* J. Clin. Invest. 93:644-651 (1994); Kiem *et al.* Blood 83:1467-1473 (1994); Salmons y Gunzberg Human Gene Therapy 4:129-141 (1993); Grossman y Wilson Curr. Opin. in Genetics and Devel 3:110-114 (1993); Bout *et al.* Human-Gene-Therapy 5:3=10 (1994), -Rosenfeld-*et al.* Science 252:431-434 (1991); Rosenfeld *et al.* Cell 68:143-155 (1992); Mastrangeli *et al.* J. Clin Invest. 91:225-234 (1993), y Walsh *et al.* Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300 (1993).

25 En algunas situaciones es conveniente proporcionar la fuente de ácidos nucleicos con un agente que se dirige a las células diana, como un anticuerpo específico para una proteína de la membrana superficial de la célula o la célula diana, un ligando para un receptor en la célula diana, etc. Cuando se utilizan liposomas, las proteínas que se unen a una proteína de la membrana superficial de la célula asociada con la endocitosis pueden ser utilizadas para marcar y/o para 30 facilitar la captación, por ejemplo, proteínas de cápside o fragmentos de las mismas trópicas de un tipo de célula en particular, anticuerpos de proteínas que se someten a la internalización en ciclos, proteínas que marcan la localización intracelular y mejorar la vida media intracelular. La técnica de la endocitosis mediada por receptor se describe, por ejemplo, por Wu *et al.*, J. Biol. Chem. 262, 4429-4432 (1987), y Wagner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414 (1990). Para la revisión de los protocolos de marcado genes y terapia génica ver Anderson *et al.*, Science 256, 35 808-813 (1992).

Dosis y Administración

Las moléculas de la invención se administran a un paciente humano, de acuerdo con procedimientos ya conocidos, 40 como administración intravenosa como un bolo o mediante infusión continua durante un período de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutánea, intra-articular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, o rutas de inhalación, y/o administración subcutánea.

En ciertas realizaciones, el tratamiento de la invención consiste en la administración combinada de un antagonista 45 de ANGPTL4 y uno o más agentes contra el cáncer, por ejemplo, agentes anti-angiogénesis. En una realización, están presentes agentes adicionales contra el cáncer, por ejemplo, uno o más diferentes agentes contra la angiogénesis, uno o más agentes de quimioterapia, etc. La invención también contempla la administración de múltiples inhibidores, por ejemplo, anticuerpos múltiples para el mismo antígeno, o múltiples anticuerpos contra el cáncer de moléculas activas diferentes. En una realización, un cóctel de diferentes agentes de quimioterapia se administra con antagonista de 50 ANGPT4 y/o uno o más agentes anti-angiogénesis. La administración combinada incluye la administración conjunta, utilizando formulaciones separadas o una fórmula farmacéutica única, y/o la administración consecutiva en cualquier orden. Por ejemplo, un antagonista de ANGPTL4 puede preceder, seguir, alternarse con la administración de los agentes contra el cáncer, o se puede administrar simultáneamente con los mismos. En una realización, hay un período de tiempo, donde dos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas.

55 Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosis adecuada de antagonista de ANGPTL4 dependerá del tipo de enfermedad a tratar, tal como se define más arriba, la gravedad y la evolución de la enfermedad, si el inhibidor se administra con fines preventivos o terapéuticos, la terapia anterior, la historia clínica del paciente y la respuesta al inhibidor, y la discreción del médico que trata. El inhibidor se administra adecuadamente al paciente 60 de una vez o a través de una serie de tratamientos. En un régimen de terapia combinada, las composiciones de la invención se administran en una cantidad terapéuticamente efectiva o una cantidad terapéuticamente sinérgica. Como se usa aquí, una cantidad terapéuticamente efectiva es tal que la administración de una composición de la invención y/o la co-administración de un antagonista de ANGPTL4 y uno o varios otros agentes terapéuticos, resulta en la reducción o inhibición de la enfermedad o condición objetivo. El efecto de la administración de una combinación de 65 agentes puede ser aditivo. En una realización, el resultado de la administración es un efecto sinérgico. Una cantidad terapéuticamente sinérgica es la cantidad de antagonista de ANGPHA y uno o varios otros agentes terapéuticos, por ejemplo, un inhibidor de angiogénesis, necesaria para reducir o eliminar de forma sinérgica o significativa las condiciones o los síntomas asociados con una enfermedad en particular.

Dependiendo del tipo y de la severidad de la enfermedad, aproximadamente 1 $\mu\text{g/kg}$ a 50 mg/kg (por ejemplo 0,1-20 mg/kg) de antagonista de ANGPTL4 o un inhibidor de la angiogénesis es una dosis inicial candidata para la administración al paciente, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o por perfusión continua. Una dosis diaria típica puede variar desde los aproximadamente 1 $\mu\text{g/kg}$ a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para la administración repetida durante varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento se mantiene hasta que se produce la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles. Normalmente, el médico administra una molécula(s) de la invención, hasta que se alcanza una dosis que proporciona el efecto biológico necesario. El progreso de la terapia de la invención se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

Por ejemplo, la preparación y los esquemas de dosificación para los inhibidores de angiogénesis, por ejemplo, anticuerpos anti-VEGF, tal como Avastin® (Genentech), pueden utilizarse según las instrucciones del fabricante o determinarse empíricamente por parte del médico experto. En otro ejemplo, la preparación y esquemas de dosificación para estos agentes quimioterápicos pueden ser utilizados de acuerdo a las instrucciones del fabricante o determinarse empíricamente por parte del médico experto. La preparación y los esquemas de dosificación para la quimioterapia también se describen en *Chemotherapy Service in Chemotherapy*, M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992).

Eficacia del tratamiento

La eficacia del tratamiento de la invención puede medirse mediante diversos criterios de valoración utilizados en la evaluación de trastornos neoplásicos o no neoplásicos. Por ejemplo, los tratamientos de cáncer pueden evaluarse, por ejemplo, pero no limitado al mismo, mediante la regresión del tumor, la reducción del peso o del tamaño del tumor, el tiempo hasta la progresión, la duración de la supervivencia, la supervivencia libre de progresión, el índice global de respuesta, la duración de la respuesta y la calidad de vida. Debido a que los agentes anti-angiogénicos aquí descritos marcan la vasculatura del tumor, y no necesariamente las propias células neoplásicas, representan una clase única de fármacos contra el cáncer y, por lo tanto, pueden requerir medidas únicas y definiciones de las respuestas clínicas a los fármacos. Por ejemplo, una reducción del tumor mayor del 50% en un análisis bidimensional es el corte estándar para declarar una respuesta. Sin embargo, los inhibidores de la invención pueden provocar la inhibición de la diseminación metastásica sin reducción del tumor primario, o simplemente pueden ejercer un efecto tumorostático. Por consiguiente, se pueden emplear aproximaciones para determinar la eficacia de la terapia, incluyendo por ejemplo, la medición de plasma o marcadores urinarios de angiogénesis y la medición de la respuesta a través de imágenes radiológicas.

En una realización, la invención puede utilizarse para aumentar la duración de la supervivencia de un paciente humano susceptibles o diagnosticado con un trastorno no neoplásico o neoplásico, por ejemplo, cáncer. La duración de la supervivencia se define como el tiempo desde la primera administración del fármaco hasta la muerte. En un aspecto, un antagonista de ANGPTL4 de la invención se administra al paciente humano en combinación con uno o más agentes contra el cáncer, con lo que la duración de la supervivencia del paciente se aumenta de manera efectiva en comparación con un único tipo de terapia en solitario, por ejemplo, aumentó en un 5% aproximadamente, o aumentó en un 10% aproximadamente, o aumentó en un 20% aproximadamente o aumentó en un 30% aproximadamente o aumentó en un 40% aproximadamente o aumentó en un 50% aproximadamente o más, en comparación con el tipo de terapia única.

En otra realización, la invención proporciona procedimientos para aumentar la supervivencia libre de progresión de un paciente humano susceptible o diagnosticado con un trastorno no neoplásico o neoplásico, por ejemplo, cáncer. El tiempo hasta la progresión de la enfermedad se define como el tiempo de la administración del fármaco hasta la progresión de la enfermedad. En una realización, el tratamiento de combinación de la invención utilizando antagonista ANGPTL4 y uno o más agentes contra el cáncer aumenta significativamente la supervivencia libre de progresión en al menos unos 2 meses, al menos unos 4 meses, por lo menos unos 6 meses, por lo menos unos 8 meses, un año o más, en comparación con un tratamiento contra el cáncer en solitario.

En otra realización, el tratamiento de la invención aumenta significativamente el índice de respuesta en un grupo de pacientes humanos o susceptibles de diagnóstico de un cáncer que son tratados con terapias distintas. El índice de respuesta se define como el porcentaje de pacientes tratados que respondieron al tratamiento. En una realización de la invención, el tratamiento de combinación de la invención utilizando antagonistas de ANGPTL4 y uno o más agentes contra el cáncer aumenta significativamente el índice de respuesta en el grupo de pacientes tratados en comparación con el grupo tratado con un solo tipo de terapia contra el cáncer (por ejemplo, la quimioterapia solamente), teniendo dicho aumento un valor p chi-cuadrado, por ejemplo, menor de 0,010, o menor de 0,005, o menor de 0,001.

En un aspecto, la invención proporciona procedimientos para aumentar la duración de la respuesta en un paciente humano o un grupo de pacientes humanos susceptibles o con diagnóstico de un cáncer. La duración de la respuesta se define como el tiempo de la respuesta inicial a la progresión de la enfermedad. En algunas realizaciones de la invención, un tratamiento combinado de la invención utilizando antagonistas de ANGPTL4 y uno o más agentes contra el cáncer, puede obtener un aumento estadísticamente significativo de, por ejemplo, al menos 2 meses, por lo menos 4 meses, por lo menos 6 meses de duración de la respuesta.

Artículos de Fabricación

En otra realización de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un contenedor, una etiqueta y un prospecto. Contenedores adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringuillas, etc. Los contenedores pueden formarse de una variedad de materiales, tal como vidrio o plástico. El contenedor tiene una composición que es eficaz para el tratamiento de la enfermedad y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el contenedor puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial con un tapón que se puede perforar mediante una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un modulador de ANGPTL4. En la etiqueta, o asociada con la misma, los contenedores indican que la composición se utiliza para tratar la condición de la elección. El artículo de fabricación de dichos productos podrá incluir un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como salino tamponado fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Asimismo, podrá incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo agentes activos adicionales, otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringuillas.

Depósito de Materiales

El siguiente material ha sido depositado en la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA. 20110-2209, EE.UU. (ATCC):

Material	ATCC No.	Fecha de Depósito
ANGPTL4 (NL2 ADN-22780-1078)	209284	18/9/97
Línea celular de hibridoma que produce Anticuerpo A4.6.1	ATCC HB-10709	29/3/91

El depósito ha sido realizado conforme a las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Fines del Procedimiento en materia de Patentes y su Reglamento (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años a partir de la fecha de depósito. Los depósitos estarán disponibles por ATCC en los términos del Tratado de Budapest, y con sujeción a un acuerdo entre Genentech, Inc. y ATCC, que asegura la disponibilidad permanente y sin restricciones de la progenie del cultivo de los depósitos al público, previa concesión de las patentes de los EE.UU. o en el momento pertinente por el que se haga pública cualquier solicitud de patente de los EE.UU. o extranjera, lo que ocurra primero, y asegura la disponibilidad de la progenie para alguien determinado por el Comisionado de EE.UU. de Patentes y Marcas que tenga derecho a ello de acuerdo con 35 USC § 122 y las normas del Comisionado en virtud del mismo (incluyendo 37 CFR § 1.14, con particular referencia a 886 OG 638).

El cesionario de la solicitud acordó que si un cultivo de los materiales en depósito muere o se pierde o destruye, cuando se cultiva en condiciones adecuadas, el material será inmediatamente reemplazado por otro bajo la notificación con otro igual. La disponibilidad del material depositado no debe interpretarse como una licencia para la práctica de la invención, en contravención de los derechos concedidos bajo la autoridad de un gobierno de conformidad con sus leyes de patentes.

Ejemplos

Se entiende que los depósitos, los ejemplos y las realizaciones aquí descritas son sólo para fines ilustrativos y que varias modificaciones o cambios a la vista de los mismos se sugerirán a los expertos en la materia y pueden incluirse en el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Los reactivos disponibles comercialmente a los que se refieren en los ejemplos fueron utilizados según las instrucciones del fabricante, a menos que se indique lo contrario.

Ejemplo 1*ANGPTL4 estimula la proliferación de células tumorales y la migración celular*

Generación de vectores adenovirales y transducción: Construcciones adenovirales han sido construidas mediante clonación de la inserción de ADNc *NotI-NotI* en el sitio de enlace múltiple de los equipos de construcción de vectores Ad-easy de Stratagene (LaJolla, CA), esencialmente tal como se describe por el fabricante. Véase, por ejemplo, Hesser et al Blood, 104 (1):149-158 (2004).

Generación de proteína marcada con una sola indicación hAngptl4 (23-406) (PUR9384), mAngptl4 (184-410)-IgG (PUR938) y mAngptl4 (23-410) (PUR9452): Fluido de cultivo celular cosechado se pasó toda la noche en resina anti-flag M2 (Sigma # A-2220). La columna fue lavada en línea de base con PBS, eluida a continuación con 50 mM citrato de Na pH 3.0. Este volumen se concentró en Amicon-15 10.000 MWO (Millipore # UFC901024). La etapa final fue la diálisis en 1 mM HCl/Super QH₂O y filtración 0,2µm. Un gel page 4-20% tris/glicina (Invitrogen # EC6028box) SDS +/- 10 mM DTT se utilizó para determinar la pureza. Las proteínas de corrección fueron identificadas mediante espectrometría de masas o secuenciado de Edman n-terminal.

Generación de marca de indicación n-terminal 14 Angptl4(184-406)-IgG(PUR 9441) seguido en serie mediante una marca Fc hu n-terminal: Fluido de cultivo celular cosechado pasó la noche en ProSep A (Amersham #113111835). La columna fue lavada en línea de base con PBS. A continuación, una etapa de lavado con un volumen de cuatro columnas de 0,5M TMAC/PBS pH 7,5 fue seguida de un lavado de PBS en la línea de base. La etapa de elución fue un bombeo de 50 mM citrato de Na pH 3,0. Este volumen se concentró en Amicon-15 10000 MWCO (Millipore # UFC901024). La etapa final fue la diálisis en 1 mM HCl/Super Q H₂O y filtración 0,2 µm. Un gel page 4-20% tris/glicina (Invitrogen # EC6028box) SDS +/- 10 mM DTT se utilizó para determinar la pureza. Las proteínas de corrección fueron identificadas mediante cualquiera de espectrometría de masas o secuenciado de Edman n-terminal. Las proteínas recombinantes también se pueden realizar utilizando técnicas estándar conocidas en la técnica.

Generación de Ad=ANGPTL4-SiARN: 4 moléculas potenciales ANGPTL4-SiARN (Qiagen) se generaron en base a la secuencia hANGPTL4 de longitud completa. Una ANGPTL4-SiARN fue seleccionada basándose en la capacidad del SiARN para inhibir la expresión de hANGPTL4. Se marcó la siguiente secuencia de ADN objetivo GTGGC CAAGCCTGCCGAAGA (SEQ ID N°3) de ANGPTL4, por ejemplo, r(GGCCAAGCCUGCCCGAAGAUU) (SEQ ID N°4) y/o r(UCUUCGGGCAGGCUUGGCCAC) (SEQ ID No.5). El SiARN fue clonado en el vector de transferencia CMVpShuttle-H1.1 con un promotor de ARN, por ejemplo, el promotor de H1 I (GenScript). El cassette de expresión de SiARN fue clonado para generar una construcción de AdhANGPTL4-SiARN adenoviral. Por ejemplo, se han construido construcciones adenovirales mediante la clonación de la inserción de ADNc NotI-NotI en el sitio de enlace múltiple de la los equipos de construcción de vectores Ad-easy de Stratagene (La Jolla, CA), esencialmente tal como se describe por el fabricante. Véase, por ejemplo, Hesser *et al.*, Blood, 104 (1):149-158 (2004).

La expresión de ANGPTL4 fue verificada mediante análisis de Western blot utilizando un anticuerpo anti-FLAG. Un clon que se expresa fuerte fue seleccionado y los títulos fueron amplificados de acuerdo con las instrucciones de fabricación. Las preparaciones virales fueron purificadas por centrifugación CsCl y se probaron para reversiones mediante PCR. Los títulos virales se determinaron mediante experimentos de lisis celular de 96 pocillos de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Estos vectores, junto con el suministro de pShuttleCMV-lacZ, se recombinan, en bacterias competentes electro BJ5183 con el vector de AdEasy que contiene el genoma Ad5 suprimido para las regiones E1 y E3. Se prepararon stocks virales primarios mediante transfección transitoria de los plásmidos AdEasy recombinados en células HEK293 huésped. Los stocks de adenovirus también se amplificaron en células HEK293 y se purificaron utilizando el procedimiento de purificación de gradiente de CsCl tal como se describe por el fabricante. Los títulos de adenovirus de trabajo fueron obtenidos mediante ensayo ELISA.

Generación de mANGPTL4: 293 células fueron transfectadas transitoriamente con una construcción que contiene un ácido nucleico que codifica el mANGPTL4 (1-410) de longitud completa. mANGPTL4 se purificó a partir del sobrenadante y se utilizó para experimentos.

Proliferación de células tumorales in vitro: ANGPTIA estimuló la proliferación de células tumorales de rhabdomyosarcoma A673 humanas (HTB 1598) *in vitro*. Ver la Figura 4, Panel A. Las construcciones de adenovirus de Ad-Angptl4, Ad-LacZ, Ad-Angptl13 se generaron tal como se describió anteriormente (Hesser *et al.*, Blood, 104 (1): 149-158 (2004)). Las células A673 fueron transducidas ya sea con una construcción que comprende la construcción de adenovirus-ANGPTL4 (Ad-Angptl4), la construcción de adenovirus-LacZ (Ad-LacZ) como control o la construcción de adenovirus ANGPTL3 (Ad-Angptl3) en la multiplicidad de la infección (MOI) de 100. Después de 3 días de crecimiento de las células A673 en 5% de FCS alta glucosa DMEM, se contaron las células. Como se indica en la Figura 4, Panel A, la proliferación de células tumorales Ad-Angptl4 estimuladas. Alrededor de un aumento superior a 2 veces del número de células se apreció en las células tratadas con Ad-Angptl4 en comparación con el Ad-LacZ de control. Ad-Angptl4 estimuló la proliferación de células MCF7 (adenocarcinoma de mama humano) alrededor de 3 veces, células TK10 (línea de cáncer renal) aproximadamente 2 veces, y células A549 (carcinoma de pulmón humano) alrededor de 1,5 veces en comparación con el control. Ad-Angptl4 también estimuló la proliferación de las células U87MG; Véase la Figura 4, Panel B, donde las células (A673, U87MG, 4T-1, o Caki) fueron transducidas ya sea con una construcción que comprende la construcción de ANGPTL4 adenovirus (Ad-Angptl4 (2)), la construcción de adenovirus-LacZ (Ad-LacZ (1)), como control o la construcción de adenovirus ANGPTL4-SiARN (3) en la multiplicidad de la infección (MOI) de 500. Después de 2-3 días de crecimiento de las células en 5% de FCS alta glucosa DMEM, se contaron las células.

Medio acondicionado de células COS transducidas con ANGPTL4 también indujeron la proliferación de las células A673. Ver Figura 4, Panel C. El medio acondicionado (sobrenadante) de los hepatocitos (HEPA) (A), las células endoteliales microvasculares (HMEC), las células (B), o COS7 (C) que se transdujeron con construcciones de adenovirus (Ad-Angptl4-(2), Ad-LacZ (1) o Ad Angptl3 (4) se añadieron a las células A673. Después de 4 días de crecimiento de las células A673 en 5% de FCS alta glucosa DMEM, se contaron las células. Como se indica en Figura 4, Panel C, el sobrenadante de células COS + Ad-Angptl4 estimuló la proliferación de células tumorales en comparación con los controles y otros sobrenadante de otros tipos de células que se usaron, por ejemplo, células Hepa y células HMVEC.

Actividad de Angptl4 cuando están cubiertas en placas de cultivo: La proliferación de células A673 mediante Angptl4 también fue examinada por la proteína de revestimiento en platos de cultivo. Las placas fueron recubiertas con Angptl4 murino, LZ-hAngptl4, fibronectina, proteína NL4 de control, IgG-hAngptl4 (184-406), mAngptl3, hAngptl3, mAngptl4 (23-410), LZ-hAngptl4 (184-406), FC-hAngptl4 (184-406) o BSA, en diferentes concentraciones, por ejemplo, sin revestimiento, 0,3 µg/ml 3,0 µg/ml o 30 µg/ml. Placas de fondo plano de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc, Dinamarca) se recubrieron durante la noche a 4°C. Las células tumorales A673 humanas fueron cosechadas y se diluyeron en 10⁵ células/ml en medio HG-DMEM con 5% de FCS. Las suspensiones celulares (10⁴ células/pocillo) en 200 µl se añadieron a los pocillos recubiertos con película y las placas fueron incubadas a 37°C durante las horas seleccionadas. Las células no adherentes fueron retiradas mediante lavado con PBS y la adhesión celular se midió utilizando cristal violeta o el procedimiento de Landegren PNAG. Ver, Landegren, U. (1984) J. Immunol. Methods 67:379-388. Los resultados se expresan en valores DO₅₅₀ o DO₄₀₅ promedio de pocillos triplicados, respectivamente.

De modo similar, las células endoteliales de la vena umbilical humana primaria (HUVEC), epiteliales (PAI) y mesangiales (MESA), células aisladas de cualquiera de los cordones umbilicales humanos o de riñones humanos (Cambrex) se cosecharon y probaron usando las mismas condiciones. Para el ensayo de proliferación fue utilizado el medio suministrado a cada tipo de célula por el fabricante (Cambrex). ANGPTL4 pareció que no inducía proliferación de células renales epiteliales, células renales mesangiales o células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), pero no indujeron la proliferación de A673 (Figura 5).

Análisis FACS de ANGPTL4 que se une a células A673: La unión de ANGPTL4 a células A673 fue examinada mediante análisis FACS. Las células A673 se sembraron en 10 cm de platos cultivados en 500.000 a 1 x 10⁶ células/pocillo de muestra. Las células se dividieron el día antes de la FACS. Las células se lavaron una vez con PBS y luego se añadieron 10 ml de 20 mM EDTA en PBS y se incubó durante 10 a 20 minutos. Después de 20 minutos, las células fueron raspadas de la placa. Se añadieron 10 ml de 5% de FCS en PBS y las células fueron transferidas a un tubo Falcon 50 ml. Las células fueron centrifugadas en 1,8 K rpm durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante fue retirado y las células se resuspendieron en 1 ml de 5% de FCS en PBS. 100 µl de suspensión celular se distribuyó en tubos de 5 ml FACS que contiene 1 µg de proteína y se incubó durante 30 minutos o más en hielo. Se utilizaron las proteínas siguientes: mAngptl4 (23-410), PUR 9452, 0,428 mg/ml (2 µl/muestra); hAngptl4 (23-406), PUR 9384, +/- 90 mg/ml (10 µl/muestra); hAngptl4 (184-406)-IgG, PUR 9441, 1,5 mg/ml (1 µl/muestra), e indicadores de control-BAP (Sigma) 0,1 mg/ml (2 µl/muestra). Después de la incubación, los tubos se llenaron con 5 ml de 5% de FCS en PBS sobre hielo. Las células fueron centrifugadas durante 5 minutos a 2K rpm. El sobrenadante fue eliminado. Fue agregado anticuerpo anti-Flag-FTTC (Sigma) (2 µl de anticuerpo (100 mg/ml stock) y se incubó en hielo durante 5 minutos o más. La concentración final de anticuerpos fue de 1 µg/ml. Se añadieron 5 ml de FCS 5% en PBS y las células fueron centrifugadas 5 minutos a 1,8 rpm K a 4°C. El sobrenadante fue retirado y las células se resuspendieron en 0,25 ml de PBS con 5% de FCS en hielo. También puede estar presente 0,05% ácido sódico para evitar que la internalización del receptor. Se puede añadir 1 µl de 1:50 stock diluido de yoduro de propidio (PI) por muestra. Las células fueron sometidas a FACS. Diversas formas de ANGPTL4, tanto humano como murino se unen a las células A673 (Figura 6, Panel A) bajo diversas condiciones (Figura 6, Panel B), normoxia, hipoxia (0% de O₂, durante 24 horas, o PMA (200 nM durante 24 horas). Para los experimentos de hipoxia, las células fueron incubadas durante 24 horas a 37°C en 5% de CO₂, 95% incubador de N₂ durante 24 horas. Alternativamente, las células fueron activadas en presencia de 200 nM phorbolLeste (PMA) en una incubadora a 37°C, 5% de CO₂ y condiciones normóxicas.

Medio acondicionado de células que expresan ANGPTL4: La proliferación de células A673 utilizando medio condicionado de células que expresan Angptl4 o añadiendo Angptl4 recombinante fue examinada. 500 µl de medio acondicionado (sobrenadante) de COS7 transducidas con construcciones con adenovirus (Ad-Angptl4 (2), Ad-LacZ (1) o Ad-LacZ + rmAngptl4 (23-410) (3) (5 mg/ml)) se añadieron a las células A673. Después de que las células fueron cultivadas durante 7 días (Figura 7, Panel A) en medio que contiene 5% de FCS, alta glucosa DMEM, las células fueron contadas. La proliferación de A673 fue examinada también mediante la adición Angptl4 recombinante al medio con 5% de FCS y creciendo las células durante 4 días. No hubo adición (1), o un control de tampón (2), mAngptl4 (23-410) (2,5 µg/ml) (3), hAngptl4 (23-406) (2,5 µg/ml) (4), hIgG-hAngptl4 (184-406) (2,5 µg/ml) (5) o hIgG-mAngptl4 (184-410) (2,5 µg/ml) (6) se añadieron en el medio en la concentración indicada. Después de que las células fueron cultivadas durante 4 días (Figura 7, Panel B) en medio que contenía 5% de FCS, alta glucosa DMEM, las células fueron contadas. La proliferación de células A673 mediante medio acondicionado de células que expresan ANGPTL4 o proteína recombinante añadidas al medio pueden ser células dependientes de la densidad. Ver la Figura 7, Panel A (proliferación de las células cuando se cultivan durante 7 días bajo las condiciones establecidas) y Panel B (proliferación de las células cuando se cultivan durante 4 días en las condiciones establecidas).

Angptl4 induce la migración celular: Hemos examinado la capacidad de Angptl4 para inducir la migración celular de células tumorales 4T-1 murinas. La motilidad celular se midió como se describe (véase, por ejemplo, Camenisch, et al., J. Biol Chem, 277 (19):17281-17290 (2002)) utilizando insertos de cultivo de tejido HTS Multiwell con 3 µm de tamaño de poro (Becton Dickinson, NJ). hANGPTL4 (1-406) se diluyó en 50/50/0,1% BSA a 5, 1 y 0,2 mg/ml. Como control positivo, las membranas fueron incubadas con 10% de suero fetal bovino (FCS) que contiene medio o 0,1 mg/ml de PDGF-BB humano recombinante (R&D Systems). Se utilizó 50/50/0,1% BSA como control negativo. Las células tumorales de ratón 4T1 se lavaron tres veces con PBS, se cosechan y suspendieron en aproximadamente 10⁵ células/ml en 50/50/0,1% BSA. Las preparaciones celulares siguientes se probaron, donde mANGPTL4 está indicado como NL2.

ES 2 339 789 T3

4T-1	
50/50/0,1% BSA	NL2 5 ug
10% FBS	NL2 0,5 ug
10% FBS	NL2 0,2 ug
50/50/0,1% BSA	PDGF-BB 0,1 ug

Las preparaciones se añadieron a la cámara inferior y las preparaciones fueron incubadas a 37°C durante 19 horas.

La suspensión celular (250 μ l) fue añadida a la cámara superior y las células se les permitió emigrar durante la noche a 37°C en una incubadora humidificada al 5% de CO₂. Después de la incubación, el medio fue aspirado desde las cámaras superior e inferior, y las células que habían migrado a la superficie inferior de la membrana se fijaron con metanol (400 μ l MeOH durante 30 minutos a 4°C, retirar MeOH y secar al aire durante 40 minutos) y se tiñeron con yoduro YO-PRO-1 (Molecular Probes, OR) (400 μ l de yoduro YO-PRO-1 de 10 μ M (1:100 de 1 mM stock)). Los resultados de las migraciones se cuantifican en términos del número promedio de células/campo microscópico en un aumento de 20 veces usando el software Openlab software (Improvision, MA).

En otro experimento, se encontró que Angptl4 inducía la migración de células A673, junto con la migración de células tumorales 4T-1. mANGPTL4 se diluyó en 50/50/0,1% BSA a 6, 1,5 y 0,375 μ g/ml. Como control positivo, las membranas fueron incubadas con 10% suero fetal bovino (FCS) que contiene medio o 0,1 μ g/ml de PDGF-BB humano recombinante (R&D Systems). 50/50/0,1% BSA se utilizó como control negativo. Las células 4T-1 y A673 fueron cosechadas y se resuspendieron en 50/50/0,1% BSA (2x10⁵ células/ml). Los siguientes preparativos celulares se probaron, donde mANGPTL4 está indicado como NL2.

4T-1		A673	
50/50/0,1% BSA	NL2 6 mg	50/50/0,1% BSA	NL2 6 mg
10% FBS	NL2 1,5 mg	10% FBS	NL2 1,5 mg
10% FBS	NL2 0,375 mg	10% FBS	NL2 0,375 mg
50/50/0,1% BSA	PDGF-BB 0,1 mg	50/50/0,1% BSA	NL2 0,375 mg

Las preparaciones se añadieron a la cámara inferior en 750 μ l y las preparaciones fueron incubadas a 37°C durante 19 horas.

La suspensión celular (250 μ l) (5x10⁴) fue añadida a la cámara superior y las células se les permitió emigrar durante 7 horas a 37°C en una incubadora humidificada al 5% de CO₂. Después de la incubación, el medio fue aspirado desde las cámaras superior e inferior, y las células que habían migrado a la superficie inferior de la membrana que se fijaron con metanol (400 μ l de MeOH durante 30 minutos a 4°C, retirar MeOH y secar al aire durante 40 minutos) y se tiñeron con yoduro YO-PRO-1 (Molecular Probes, O) (400 μ l yoduro YO-PRO-1 de 10 μ M (1:100 de 1 mM stock)). Los resultados de las migraciones se cuantificaron en términos del número promedio de células/campo microscópico en un aumento de 20 veces con el software Openlab (Improvisación, MA). Ver la Figura 9, donde (1) no es suero añadido, (2) es 10% de suero fetal bovino (FCS), (3) es PDGF-BB, y (4) es ANGPTL4. Utilizando ANGPTL4 y 10% de células migradas FCS, A673 y 4T-1. Por lo tanto, los antagonistas de Angptl4 pueden utilizarse para inhibir la metástasis, por ejemplo, sin estar sujetos a una teoría, mediante la prevención de la migración de las células tumorales.

ANGPTL4 aumenta el tamaño del tumor *in vivo*: Células humanas de rabdomiosarcoma A673 (HTB 1598) fueron cultivadas como se describió anteriormente (Kim *et al.*, Nature 362:841-844 (1993), y Gerber *et al.*, Cancer Research, 60:6253-6258 (2000)). Cinco x 10⁶ células A673 de 0,1 ml de Matrigel se inyectaron s.c. en la región del flanco dorsal de ratones desnudos beige (Harlan Sprague Dawley) para establecer xenoinjertos. La construcción de un adenovirus inyectó 1 x 10 unidades formadoras de placas (UFP), intratumoral (IT), q7d el día 1, 7 y 14. Las inyecciones se realizaron directamente en la masa tumoral, por un lado y por debajo, con una aguja de calibre 28 y una jeringuilla de tuberculina 0,5 ml. Las construcciones de adenovirus eran una construcción de adenovirus-ANGPTL4 (Ad-Angptl4), una construcción de adenovirus-LacZ (Ad-LacZ) como un control o una construcción de adenovirus-ANGPTL3 (Ad-Angptl3). El tamaño del tumor se determinó en varios días posteriores a la implantación del tumor. Las mediciones del

tamaño del tumor se realizaron cada dos días y el volumen del tumor se calculó utilizando las fórmulas de volumen elipsoidal $\pi/6 \times L \times W \times H$, donde L = longitud, W = anchura, y H = altura; Tomayko y Reynolds, Cancer Chemother. Pharmacol, 24:148-154 (1989)). Como se observa en la Figura 8, el tamaño del tumor (Panel A) y el peso (Grupo B) aumentó estadísticamente ($P < 0,0001$) en ratones inyectados con células A673 y una construcción de adenovirus-ANGPTL4 (Ad-Angptl4) en comparación con las construcciones Ad-LacZ o Ad-Angptl3.

Ejemplo 2

Evolución para escapar de tratamiento con anti-VEGF de tumores tratados con ANGPTL4

ANGPTL4 estimuló la proliferación de células tumorales en tumores tratados con un agente de anti-angiogénesis, por ejemplo, anti-VEGF (como Avastin® (Genentech, South San Francisco). Véase la Figura 8, Panel C. Las células humanas de rhabdomyosarcoma A673 (HTB 1598) fueron cultivadas como se describió anteriormente (Kim *et al.*, Nature 362:841-844 (1993), y Gerber *et al.*, Cancer Research, 60:6253-6258 (2000)). Cinco $\times 10^6$ células A673 de 0,1 ml de Matrigel se inyectaron s.c. en la región del flanco dorsal de ratones desnudos beige (Harlan Sprague Dawley) para establecer xenoinjertos. Una construcción de adenovirus se inyectó 1×10^8 unidades formadoras de placas (UFP), intratumoral (IT), q7d en el día 1, 7, 14, 21 y 28. Las construcciones de adenovirus eran una construcción de adenovirus-ANGPTL4 (Ad-Angptl4), una construcción de adenovirus-LacZ (Ad-LacZ) como un control o una construcción de adenovirus-ANGPTL3 (Ad-Angptl3). Los ratones fueron tratados con Avastin® (Genentech) con una dosis de 5 mg/kg, ip, dos veces por semana. Las inyecciones se realizaron directamente en la masa tumoral, desde un lado y por debajo, con una aguja de calibre 28 y una jeringuilla de tuberculina 0,5 ml. Las mediciones del tamaño del tumor se realizaron cada dos días y el volumen del tumor se calculó utilizando las fórmulas de volumen elipsoidal $\pi/6 \times L \times W \times H$, donde L = longitud, W = anchura, y H = altura; Tomayko y Reynolds, Cancer Chemother. Pharmacol., 24:148-154 (1989)). Como se observa en la Figura 8, Panel C, el tamaño del tumor aumentó en los ratones inyectados con una construcción de adenovirus-ANGPTL4 (Ad-Angptl4) a pesar de que estaban siendo tratados con Avastin®, en comparación con los ratones inyectados con células que contienen una construcción de Ad-LacZ o Ad-Angptl3, en combinación con la terapia con Avastin®.

Ejemplo 3

Anticuerpos que se unen a ANGPTL4 que inhiben el crecimiento de células tumorales

La capacidad de los anticuerpos anti-ANGPTL4 para inhibir la actividad biológica de los ANGPTL4, por ejemplo, la proliferación de células tumorales, se ha probado. 1×10^4 células tumorales (por ejemplo, HeLa-S3, Caki, U87MG, 293, A673, HM7 y Calu 6)/pocillo se depositaron en 12 placas de pocillos en medio con 10% de FCS. A las células se les permitió incubarse durante la noche a 37°C en una incubadora humidificada al 5% de CO₂. El medio se cambió al 5% de FCS (excepto para células Calu 6 que era del 10% de FCS) y se añadieron 1, 2,5, 5 ó 10 mg/ml de anticuerpos anti-hANGPTL4 o anti-DSCR o ningún anticuerpo a los pocillos. Las placas se colocaron a 37°C en una incubadora humidificada al 5% de CO₂. Las células se contaron en el día 2 ó 3 después de la adición del anticuerpo anti-hANGPTL4. El anticuerpo anti-ANGPTL4 inhibió el crecimiento de células de HeLa-S3, Caki U87MG, 293, A673, y Calu 6, pero no células HM7. Ver la Figura 10, Panel A y B.

Ejemplo 4

Preparación de anticuerpos que se unen a ANGPTL4

Técnicas para producir anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales son conocidas en la técnica y aquí se describen. Antígenos (o inmunógenos) que pueden ser utilizados incluyen la proteína purificada de la invención, fragmentos de proteínas, proteínas de fusión que contienen estas proteínas, y las células que expresan la proteína recombinante y/o fragmentos de proteínas en la superficie celular. La selección de los antígenos puede realizarse por parte del experto sin experimentación indebida.

Los ratones, tales como Balb/c, son inmunizados con el antígeno emulsionado en adyuvante completo de Freund y se inyectan por vía subcutánea o por vía intraperitoneal en una cantidad de 1-100 microgramos. Alternativamente, el antígeno se emulsiona en adyuvante MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, Mont.) y se inyecta en las almohadillas de alimentos traseras del animal. Los ratones inmunizados a continuación se aceleraron de 10 a 12 días más tarde con el antígeno adicional emulsionado en el adyuvante seleccionado. Posteriormente, durante varias semanas, los ratones también pueden ser acelerados con inyecciones de inmunización adicionales. Las muestras de suero pueden obtenerse de forma periódica de los ratones por sangrado retro-orbital para los ensayos de pruebas de ELISA para detectar los anticuerpos.

Después de que se haya detectado un título de anticuerpos adecuado, los animales "positivos" para los anticuerpos pueden ser inyectados con una inyección intravenosa final del ligando determinado. Tres a cuatro días más tarde, los ratones son sacrificados y las células del bazo se cosechan. Las células del bazo a continuación se funden (usando 35% de polietileno glicol) a una línea celular de mieloma murino seleccionado como P3X63AgU.1, disponible de ATCC, CRL N° 1597. Las fusiones generan células de hibridoma que pueden colocarse a continuación en placas de 96 pocillos de cultivo de tejidos que contienen medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) para inhibir la proliferación de las células fusionadas, híbridos de mieloma e híbridos de células de bazo.

Las células del hibridoma se cribarán en un ELISA para la reactividad contra el antígeno. La determinación de células de hibridoma “positivas” que secretan los anticuerpos monoclonales deseados contra ANGPTL4 aquí está dentro de la habilidad en la técnica.

5 Las células de hibridoma positivo puede ser inyectadas de manera intraperitoneal en ratones Balb/c singénicos para producir ascitis que contienen anticuerpos anti-ANGPTL4 monoclonales. Alternativamente, las células de hibridoma se pueden cultivar en frascos de cultivo de tejidos o botellas de rodillos. La purificación de los anticuerpos monoclonales producidos en la ascitis puede realizarse utilizando precipitación de sulfato de amonio, seguido por cromatografía de exclusión en gel. Alternativamente, la cromatografía de afinidad basada en la unión de anticuerpos a proteína A o
10 proteína G puede utilizarse.

Por ejemplo, anticuerpos policlonales de conejo fueron generados mediante la inmunización de conejo con 500 mg de proteína recombinante ANGPTL4 humana (23-406) generada en *E. coli* en los días 1, 40 y 70. El suero se recogió en los días 80 y 120 después de la vacunación y los anticuerpos fueron purificados mediante columnas Sephadex de
15 proteína A.

Ejemplo 5

20 *Anticuerpos de bloqueo o neutralizantes*

Anticuerpos contra los antígenos aquí descritos pueden ser identificados por una variedad de técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, ELISA. Por ejemplo, las placas pueden recubrirse con el polipéptido de interés, por ejemplo, ANGPTL4 o un fragmento del mismo, e incubados con anticuerpos generados contra el polipéptido, por ejemplo,
25 ANGPTL4 (véase, por ejemplo, la descripción de las patentes US 6.348.350, 6.372.491 y 6.455.496). Los anticuerpos unidos pueden ser detectados mediante diversos procedimientos.

Los anticuerpos antagonistas (por ejemplo, de bloqueo o neutralización) pueden ser identificados por pruebas de competencia y/o ensayos de actividad. Por ejemplo, la expresión de ANGPTL4 estimula la proliferación de células
30 tumorales, migración, adhesión o unión a $\alpha_v\beta_5$. La determinación de un bloqueo o de una neutralización de anticuerpos a ANGPTL4 puede mostrarse por la capacidad de los anticuerpos para bloquear la proliferación (véase, por ejemplo, la Figura 10, Panel A y B), migración, adhesión (véase, por ejemplo, la Figura 12) o unión de células tumorales a $\alpha_v\beta_5$ (USBiological, 37K, Swampscott, Massachusetts) (véase, por ejemplo, la Figura 13, Panel B y C). Por ejemplo, células de rhabdomyosarcoma A673 puede colocarse en placas e incubarse con sobrenadante de células COS7 transducidas
35 con Ad-hAngptl4 junto con un anticuerpo anti-ANGPTL4, o un anticuerpo de control o PBS. Después de varios días, las células pueden ser tripsinizadas y contadas. Los anticuerpos que reducen el número de células se identifican como anticuerpos de bloqueo o neutralizantes. ANGPTL4 también se ha demostrado que induce la migración celular de células tumorales y de ser un factor pro-angiogénico. Véase, por ejemplo, Le Jan *et al.*, American Journal of Pathology, 164 (5): 1521-1528 (2003). Por lo tanto, los anticuerpos de bloqueo o neutralización de ANGPTL4 se
40 pueden identificar mediante el uso de anticuerpos en combinación con ANGPTL4 en ensayos de migración de células tumorales, y/o ensayos de angiogénesis, por ejemplo, ensayo de CAM.

Los anticuerpos de bloqueo o neutralizantes contra ANGPTL4 que pueden ser utilizados en el bloqueo o reducción del crecimiento del tumor o bloquear o reducir el crecimiento de células cancerosas también pueden identificarse
45 mediante el uso de células tumorales en cultivo tal como se describe anteriormente y/o en estudios de ratones beige/desnudos. Por ejemplo, los ratones desnudos pueden ser inyectados con células tumorales. En varias ocasiones después de que se haya establecido el crecimiento del tumor, los ratones pueden ser inyectados por vía intraperitoneal una o dos veces a la semana con varias dosis de bloqueo o de anticuerpos neutralizantes ANGPTL4, control de anticuerpos, o PBS. El tamaño del tumor puede medirse cada semana, y en la conclusión del estudio del tumor puede
50 ser extirpado y pesado. Los anticuerpos de bloqueo o neutralizantes de ANGPTL4 son identificados que bloquean o reducen el crecimiento tumoral en los ratones.

Las combinaciones de anticuerpos ANGPTL4 y agente anti-angiogénesis para bloquear o reducir el crecimiento del tumor o de bloquear o reducir el crecimiento de las células cancerosas se pueden identificar mediante el uso de
55 células tumorales en cultivo tal como se describe anteriormente y/o estudios de ratones beige/desnudos. Tal como se indicó anteriormente, los ratones desnudos pueden ser inyectados con células tumorales. En varias ocasiones después de que se haya establecido el crecimiento del tumor, los ratones pueden ser inyectados por vía intraperitoneal una o dos veces a la semana con varias dosis de la combinación de un antagonista de ANGPTL4 y un agente contra el cáncer, por ejemplo un agente anti-angiogénesis, tal como anticuerpo anti-VEGF, o un antagonista de ANGPTL4, o
60 un agente contra el cáncer, o un control de anticuerpos, o PBS. El tamaño del tumor puede medirse cada semana, y en la conclusión del estudio el tumor puede ser extirpado y pesado. Las terapias de combinación de antagonistas de ANGPTL4 y agentes contra el cáncer son identificadas que bloquean o reducen el crecimiento tumoral en los ratones, o que mejoran para bloquear o reducir el crecimiento del tumor en comparación con un control o mediante un único agente en solitario.

65

Ejemplo 6

Variante de ANGPTL4

Una variante de ANGPTL4 se realizó utilizando un equipo de mutagénesis estándar (por ejemplo, QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Invitrogen, Carlsbad, California)) siguiendo el protocolo del fabricante. Se hicieron dos sustituciones de aminoácidos en la secuencia de ANGPTL4 humana (véase, por ejemplo, la Figura 2). Las sustituciones fueron en la posición 162 y 164 (R162G y R164E), resultando en un cambio de RKR a GKE. La proteína de ANGPTL4 (plásmido L280, aa 1-406) o variante de ANGPTL4 fue aislada del sobrenadante de células COS-7 transfectadas transitoriamente células. Para la purificación, el sobrenadante fue cargado en una columna de níquel. La proteína fue detectada por Western blot con un anticuerpo anti-FLAG-HRP, ver, Figura 3, Grupo B. Cuando se hicieron las sustituciones y la variante de ANGPTL4 se comparó con la proteína de ANGPTL4 nativos o de tipo salvaje, se encontró que la variante de ANGPTL4 tenía un peso molecular mayor que ANGPTL4 nativo mediante Western blot. La sustitución de RKR a GKE en la posición 162 y 164 de la proteína nativa previno la degradación proteolítica de ANGPTL4.

Ejemplo 7

ANGPTL4 se une a integrina $\alpha_v\beta_5$

Las angiopoyetinas son factores secretados que regulan la angiogénesis mediante la unión al receptor de tirosina quinasa específico Tie2 de las células endoteliales a través de su dominio de tipo fibrinógeno (FBN). El dominio super hélice presente en la familia de los ligandos secretados se consideró necesario para oligomerización ligante (véase, por ejemplo, Procopio *et al.*, J. Chem., 274:30196-201 (1999)).

Similar a la angiopoyetinas, ANGPTL3 y ANGPTL4 son glicoproteínas secretadas, consistiendo cada una un péptido de señal N-terminal, seguido por un dominio super hélice y un dominio de tipo FBN C-terminal. Se determinó que ANGPTL3 se une a $\alpha_v\beta_3$ a través del dominio de tipo FBN. Se determinó que ANGPTL4 se une a $\alpha_v\beta_5$. La línea celular 293-1953 que se transfectó establemente con integrina $\alpha_v\beta_5$ fue probada para la capacidad de unirse o adherirse a placas cubiertas con ANGPTL4. Las células fueron cosechadas y diluidas en 10^5 células/ml en medio libre de suero que contiene PBS, 1% de BSA, 1 mM CaCl_2 y 1 mM MgCl_2 . Las células fueron incubadas previamente con o sin anticuerpos de $\alpha_v\beta_5$ anti-integrina (MAB 1961 (Chemicon, Temecula, CA)) o péptidos durante 15 minutos a 37°C. mANGPTL4 recombinante, BSA o vitronectina (1 mg, 3 mg, 10 mg o 30 mg/ml) fueron recubiertos con placas de microtitulación Nunc Maxisorp de fondo plano de 96 pocillos, durante la noche a 4°C y se bloquearon con 200 μl del 3% de BSA en tampón fosfato salino (PBS), pH 7,4, durante 1,5 horas a 37°C. Las suspensiones celulares (5×10^4 células/100 μl /pocillo (5×10^5 /ml)) se añadieron a los pocillos recubiertos con película y las placas fueron incubadas a 37°C durante 5,5 horas. Las células no adherentes fueron retiradas mediante lavados con PBS y la adhesión celular se midió mediante la adición de 200 μl de CyQuant GD Dye (Molecular Probes (Invitrogen detection Technologies (Carlsbad, California)) (1:400)/tampón de lisis celular y se incubaron durante 2-5 minutos. La fluorescencia de la muestra se midió utilizando una excitación 480 nm y 520 nm de emisión máxima. El procedimiento PNAG de Landegren también se puede utilizar (véase, por ejemplo, Landegren, J. Immunol. Methods, 67:379-388 (1984)). Las células que expresan $\alpha_v\beta_5$ mostraron adhesión a ANGPTL4 y vitronectina (USBiological, Swampscott, Massachusetts), un control positivo, en comparación con BSA, un control negativo. Ver la Figura 11.

Para determinar si la integrina $\alpha_v\beta_5$ fue suficiente para mediar en la adhesión celular de ANGPTL4, los anticuerpos de bloqueo fueron analizados para determinar su capacidad de inhibir la adherencia en el ensayo de adhesión celular. Los anticuerpos de bloqueo funcionales (anticuerpos anti- $\alpha_v\beta_5$ (MAB1961 (Chemicon, Temecula, CA)) o anticuerpos anti-hANGPTL4) se añadieron a 293-1953 células antes de la incubación con los pocillos recubiertos de proteína (BSA (1), vitronectina (2) o ANGPTL4 (3)). Ver la Figura 12. Los anticuerpos anti- $\alpha_v\beta_5$ y anti-ANGPTL4 suprimieron la actividad de adhesión de la célula ANGPTL4.

Experimentos adicionales fueron realizados para confirmar que ANGPTL4 se une a $\alpha_v\beta_5$. Se realizaron experimentos ELISA para detectar si mANGPTL4, IgG-hANGPTL4-Nterminal (1-183) y/o IgG-hANGPTL4-Cterminal (184-406) se une a placas recubiertas con $\alpha_v\beta_5$ (USBiological, 37K, Swampscott, Massachusetts). 100 μl /pocillo del diluyente de integrina $\alpha_v\beta_5$ (tampón de recubrimiento 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (50 mM de carbonato/bicarbonato, pH 9,6)) con tampón de recubrimiento se incubaron durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado (PBS, pH 7,4, 0,05% Tween-20), y 100 μl /pocillo de tampón de bloqueo (PBS, pH 7,4, 0,5% BSA) se añadieron durante 1 hora a temperatura ambiente con suave agitación. Diversas cantidades (0, 0,070 μg , 0,22 mg, 0,66 mg, 2 mg o 6 mg) de muestras, mANGPTL4, IgG-hANGPTL4-Nterminal (1-183) y/o IgG-hANGPTL4-Cterminal (184-406), se prepararon en tampón de muestra (0,5% de BSA, 50 mM Tris, pH 7,4, 0,05% Tween 20, 1 mM MnCl_2 , 50 μM CaCl_2 , 50 μM MgCl_2 , 100 mM NaCl) y se incubaron durante 30 minutos. Las muestras se añadieron a las placas (100 μl /pocillo en las cantidades incubados anteriormente) y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave. Las placas fueron lavadas con tampón y 100 μl /pocillo de peroxidasa de rábano anti-Flag (HRP) (100 ng/ml) (Jackson, # 109-036-098) en tampón de ensayo (PBS, pH 7,4, 0,5% de BSA, 0,05% de Tween 20) se añadieron y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave. Las placas fueron lavadas. 100 μl /pocillo de tetrametilbenzidina (TMB) (Moss, Inc.) fueron añadidos y se incubaron en las placas hasta que se desarrolló un buen color a temperatura ambiente. 100 μl /pozo de solución de detención (1 M H_3PO_4) fueron añadidos para detener la reacción. Las placas se leyeron a 630 nm. mANGPTL4, IgG-hANGPTL4-Nterminal y IgG-hANGPTL4-C-terminal se unieron a las placas recubiertas con $\alpha_v\beta_5$, aunque un poco más de IgG-hANGPTL4-Cterminal se unió a las placas. Ver la Figura 13, Panel A.

Los anticuerpos anti-ANGPTL4 inhiben la unión de ANGPTL4 a las placas recubiertas con $\alpha_v\beta_5$. Se realizaron experimentos ELISA. 100 μ l/pocillo de diluyente de $\alpha_v\beta_5$ integrina, 1 μ g/ml de tampón de recubrimiento (50 mM de carbonato/bicarbonato, pH 9,6) con tampón de recubrimiento se incubaron durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado (PBS, pH 7,4, 0,05% de Tween-20), y 100 μ l/pocillo de tampón de bloqueo (PBS, pH 7,4, 0,5% de BSA) se añadieron durante 1 hora a temperatura ambiente con suave agitación. 0,6 μ g a 6,0 μ g de muestras, mANGPTL4, IgG-hANGPTL4-Nterminal (1-183) y/o IgG-hANGPTT4-Cterminal (183-406), en tampón de la muestra (0,5% de BSA, 50 mM Tris, pH 7,4, 0,05% de Tween 20, 1 mM de $MnCl_2$, 50 μ M $CaCl_2$, 50 μ M $MgCl_2$, 100 mM NaCl) fueron incubadas con anticuerpos anti-ANGPTL4 (1,5 mg) o anti-DSCR (1,5 mg) durante 30 minutos. Después de la incubación, 100 μ l/pocillo de muestra de +/-anticuerpo se incubaron con las placas durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave. Las placas se lavaron con tampón y 100 μ l/pocillo de anti-Flag-HRP (100 ng/ml) en tampón de ensayo (PBS, pH 7,4, 0,5% de BSA, 0,05% de Tween 20) se añadieron y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave. Las placas fueron lavadas y 100 μ l/pocillo de TMB se añadieron y se incubaron en las placas hasta que desarrolló un buen color a temperatura ambiente. 100 μ l/pozo de solución de detención (1 M H_3PO_4) fueron añadidos para detener la reacción. Las placas se leyeron a 630 nm. Los anticuerpos anti-ANGPTL4 redujeron la cantidad de unión de mANGPTL4, IgG-hANGPTL4-Nterminal y IgG-hANGPTL4-Cterminal a las placas recubiertas con $\alpha_v\beta_5$ en comparación con el anticuerpo anti-DSCR, el anticuerpo o medio monoclonal 5G7. Ver la Figura 13, Panel B.

En otro experimento, la unión de ANGPTL4 y de la integrina $\alpha_v\beta_5$ se demostró mediante ELISA. En este experimento, 80 μ l/pocillo de HANGPTL4 terminal C, vitronectina o BSA (5 μ g/ml) se añadieron a las placas en tampón de recubrimiento (50 mM de carbonato/bicarbonato, pH 9,6) y se incubaron durante la noche a 4°C. Las placas fueron lavadas (tampón de lavado: PBS, pH 7,4, 0,05% de Tween-20) y 100 μ l/pocillo de tampón de bloqueo (PBS, pH 7,4, 0,5% de BSA), con cualquiera medio, anticuerpos anti-hANGPTL4 (15 μ g/100 μ l), o anticuerpos anti-Dscr (15 μ g/100 μ g) fueron añadidos y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave. Las placas fueron lavadas y 100 μ l (3-9 mg/ml) de $\alpha_v\beta_5$ se añadieron y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave. Las placas fueron lavadas y 1 mg/ml (1:1000) de anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_5$ (Chemicon) (5 μ g/100 μ l) se añadieron en tampón de ensayo (PBS, pH 7,4, 0,5% de BSA, 0,05% de Tween 20) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave. Después de la incubación, las placas fueron lavadas y 100 μ l/peroxidasa de rábano (HRP) anti-ratón (1:5000) se añadieron en tampón de ensayo. Las placas fueron lavadas y se añadieron 100 μ l/pocillo de tetrametilbenzidina (TMB) y se incubaron a temperatura ambiente hasta que se desarrolló un buen color. La reacción se detuvo con 100 μ l/pocillo de 1 M H_3PO_4 y las placas se leyeron a 630 nm. $\alpha_v\beta_5$ se une a las placas recubiertas con ANGPTL4 (carril 1) y vitronectina (carril 4). El enlace se bloquea con anticuerpos anti-ANGPTL4 (carril 2), pero no cuando se utiliza un anticuerpo de control anti-DSCR (carril 3) o una proteína de control que está recubierta sobre las placas (carril 5). Ver la Figura 13, Panel C.

Por lo tanto, estos resultados demuestran que ANGPTL4 recombinante se une específicamente a la integrina $\alpha_v\beta_5$.

La memoria se considera suficiente para que un experto en la materia ponga en práctica la invención. Se entiende que los ejemplos y las realizaciones aquí descritas son para fines ilustrativos. La invención no se limita en su alcance por la realización depositada, ya que la realización depositada está concebida como una sola ilustración de ciertos aspectos de la invención, y las realizaciones que son funcionalmente equivalentes están dentro del alcance de la invención. El depósito del material aquí no constituye una admisión de que la descripción escrita sea insuficiente para permitir la puesta en práctica de cualquier aspecto de la invención, incluyendo su mejor modo, ni tampoco debe interpretarse como una limitación del alcance de las reivindicaciones a los ejemplos específicos que representa. De hecho, varias modificaciones además de las que se muestran y describen aquí serán evidentes para los expertos en la técnica de la descripción anterior, y están dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad al respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 6582959 B [0028] [0120]
- WO 9404690 A [0145]
- US 6703020 B [0028] [0120]
- WO 9627011 A [0146]
- WO 9845332 A [0028] [0120]
- US 4676980 A [0151]
- WO 9630046 A [0028] [0120]
- WO 9100360 A [0151]
- WO 9410202 A [0028] [0120]
- WO 92200373 A [0151]

ES 2 339 789 T3

	• EP 0666868 B1 [0028] [0120]	• EP 03089 A [0151]
	• US 20030206899 A [0028] [0120]	• US 5739277 A [0153]
5	• US 20030190317 A [0028] [0120]	• US 5053394 A [0155]
	• US 20030203409 A [0028] [0120]	• US 5770710 A [0155] [0167]
	• US 20050112126 A [0028] [0120]	• US 5877296 A [0155] [0167]
10	• US 6884879 B [0028] [0120]	• WO 9321232 A [0158]
	• EP 75444 A [0035]	• WO 9411026 A [0159] [0204]
15	• WO 0063380 A [0037]	• US 5208020 A [0159] [0163] [0164]
	• US 20030108885 A [0044][0173]	• US 3896111 A [0162]
	• US 20030082575 A [0044][0173]	• US 4151042 A [0162]
20	• EP 404097 A [0048]	• US 4137230 A [0162]
	• WO 9311161 A [0048]	• US 4248870 A [0162]
25	• US 5641870 A [0048] [0141]	• US 4256746 A [0162]
	• US 4816567 A [0049] [0050] [0125] [0132] [0134] [0136]	• US 4260608 A [0162]
30	• US 5545807 A [0052]	• US 4265814 A [0162]
	• US 5545806 A [0052]	• US 4294757 A [0162]
35	• US 5569825 A [0052]	• US 4307016 A [0162]
	• US 5625126 A [0052]	• US 4308268 A [0162]
	• US 5633425 A [0052]	• US 4308269 A [0162]
40	• US 5661016 A [0052]	• US 4309428 A [0162]
	• US 5750373 A [0052]	• US 4313946 A [0162]
45	• US 5821333 A [0060] [0071]	• US 4315929 A [0162]
	• US 5500362 A [0065]	• US 4317821 A [0162]
	• US 5821337 A [0065]	• US 4322348 A [0162]
50	• US 6348350 B [0095] [0096] [0260]	• US 4331598 A [0162]
	• US 6372491 B [0095] [0096] [0260]	• US 4361650 A [0162]
55	• US 6455496 B [0095] [0096] [0260]	• US 4364866 A [0162]
	• US 5521073 A [0097]	• US 4424219 A [0162]
	• US 5650490 A [0097]	• US 4450254 A [0162]
60	• US 5814464 A [0097]	• US 4362663 A [0162]
	• US 20030215451 A [0098]	• US 4371533 A [0162]
65	• WO 02107941 A [0103]	• EP 0425235 B1 [0164]
	• US 589875 P [0105] [0106] [0108]	• US 5712374 A [0167]
		• US 5714586 A [0167]

ES 2 339 789 T3

- WO 2006014678 A [0105] [0106] [0108]
- US 20030055006 A [0114]
- 5 • US 5565332 A [0140]
- US 5573905 A [0140]
- US 5567610 A [0140]
- 10 • US 5229275 A [0140]
- WO 9316185 A [0141]
- 15 • US 5571894 A [0141]
- US 5587458 A [0141]
- WO 9308829 A [0143]
- 20 • US 4301144 A [0184]
- US 4670417 A [0184]
- 25 • US 4791192 A [0184]
- US 4179337 A [0184]
- WO 9013646 A [0187]
- 30 • US 4965199 A [0194]
- EP 73657 A [0200]
- 35 • US 4419446 A [0202]
- US 4601978 A [0202]
- DD 266710 [0205]
- 40 • EP 402226 A [0206]
- EP 183070 A [0206]
- US 5739116 A [0167]
- US 5767285 A [0167]
- US 5770701 A [0167]
- US 5773001 A [0167]
- US 4485045 A [0169]
- US 4544545 A [0169]
- US 5013556 A [0169]
- WO 8705330 A [0182]
- US 4640835 A [0184]
- US 4496689 A [0184]
- EP 244234 A [0206]
- US 4767704 A [0210]
- US 4657866 A [0210]
- US 4927762 A [0210]
- US 4560655 A [0210]
- US 5122469 A [0210]
- WO 9003430 A [0210]
- WO 8700195 A [0210]
- US RE30985 E [0210]
- US 3773919 A [0217]
- US 6699501 B [0217]

Documentos no procedentes de patentes citados en la descripción

- **Folkman**, *N. Engl. J. Med.*, 1971, vol. 285, 1182-1186 [0003]
- 50 • **Ferrara; Alitalo**. *Nature Medicine*, 1999, vol. 5 (12), 1359-1364 [0003] [0009] [0088] [0089]
- **Ferrara et al.** *Endocrine Rev.*, 1992, vol. 13, 18-32 [0003]
- **Folkman; Klagsbrun**. *Science*, 1987, vol. 235, 442-447 [0004]
- 55 • **Ferrara**. *Recent Prog. Horm. Res.*, 2000, vol. 55, 15-35 [0004]
- **Carmeliet; Jain**. *Nature*, 2000, vol. 407, 249-257 [0005] [0114]
- 60 • **Ferrara; Davis-Smyth**. *Endocrine Rev.*, 1997, vol. 18, 4-25 [0006]
- **Ferrara**. *J. Mol. Med.*, 1999, vol. 77, 527-543 [0006]
- **Guerrin et al.** *J. Cell Physiol.*, 1995, vol. 164, 385-394 [0006]
- 65 • **Oberg-Welsh et al.** *Mol. Cell. Endocrinol.*, 1997, vol. 126, 125-132 [0006]

ES 2 339 789 T3

- **Sondell et al.** *J. Neurosci.*, 1999, vol. 19, 5731-5740 [0006]
- **Ferrara et al.** *Nature Medicine.*, 2003, vol. 9 (6), 669-676 [0007]
- 5 • **Robinson; Stringer.** *Journal of Cell Science*, 2001, vol. 114 (5), 853-65 [0007]
- **Davis et al.** *Cell*, 1996, vol. 87, 1161-1169 [0008] [0097]
- **Suri et al.** *Cell*, 1996, vol. 87, 1171-1180 [0008] [0097]
- 10 • **Maisonpierre et al.** *Science*, 1997, vol. 277, 55-60 [0008] [0097]
- **Valenzuela et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, vol. 96, 1904-1909 [0008]
- 15 • **Holash et al.** *Oncogene*, 1999, vol. 18, 5356-5362 [0008]
- **Ward; Dumont.** *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2002, vol. 13, 19-27 [0008] [0097]
- **Carmeliet.** *Nature Medicine*, 2000, vol. 6 (3), 389-395 [0009]
- 20 • **Byzova et al.** *Mol. Cell.*, 2000, vol. 6 (4), 851-860 [0009]
- **Hood; Cheresch.** *Nature Reviews*, 2002, vol. 2, 91-99 [0009]
- 25 • **Hynes; Bader.** *Thromb. Haemost.*, 1997, vol. 78 (1), 83-87 [0009]
- **Hynes et al.** *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 1999, vol. 32 (5), 501-510 [0009]
- **Elicieri; Cheresch.** *Mol. Med.*, 1998, vol. 4, 741-750 [0009]
- 30 • **Siemeister et al.** *Cancer Metastasis Rev.*, 1998, vol. 17, 241-248 [0010]
- **Kim et al.** *Nature*, 1993, vol. 362, 841-844 [0010] [0011] [0251] [0252]
- 35 • **Warren et al.** *J. Clin. Invest.*, 1995, vol. 95, 1789-1797 [0010] [0011]
- **Borgström et al.** *Cancer Res.*, 1996, vol. 56, 4032-4039 [0010]
- **Melnyk et al.** *Cancer Res.*, 1996, vol. 56, 921-924 [0010]
- 40 • **Adamis et al.** *Arch. Ophthalmol.*, 1996, vol. 114, 66-71 [0010]
- **Ferrara et al.** *Nature Reviews Drug Discovery*, 2004, vol. 3, 391-400 [0010]
- 45 • **Gerber et al.** *Cancer Research*, 2000, vol. 60, 6253-6258 [0011] [0251] [0252]
- **Ferrara et al.** *Nature Reviews: Drug Discovery*, 2004, vol. 3, 391-400 [0011] [0114]
- **Millauer et al.** *Nature*, 1994, vol. 367, 576-579 [0011]
- 50 • **Millauer et al.** *Cancer Res.*, 1996, vol. 56, 1615-1620 [0011]
- **Goldman et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, vol. 95, 8795-8800 [0011]
- 55 • **Asano et al.** *Cancer Research*, 1995, vol. 55, 5296-5301 [0011]
- **Fong et al.** *Cancer Res.*, 1999, vol. 59, 99-106 [0011]
- **Wedge et al.** *Cancer Res.*, 2000, vol. 60, 970-975 [0011]
- 60 • **Wood et al.** *Cancer Res.*, 2000, vol. 60, 2178-2189 [0011]
- **Siemeister et al.** *Cancer Res.*, 1999, vol. 59, 3185-3191 [0011]
- 65 • **Lin et al.** *J. Clin. Invest.*, 1999, vol. 103, 159-165 [0011]
- **Lin et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, vol. 95, 8829-8834 [0011]

ES 2 339 789 T3

- **Leung et al.** *Science*, 1989, vol. 246, 1306 [0027]
- **Houck et al.** *Mol. Endocrin.*, 1991, vol. 5, 1806 [0027]
- 5 • **Robinson; Stringer.** *Journal of Cell Science*, 2001, vol. 144 (5), 853-865 [0027]
- **Popkov et al.** *Journal of Immunological Methods*, 2004, vol. 288, 149-164 [0028] [0120]
- **Presta et al.** *Cancer Res.*, 1997, vol. 57, 4593-4599 [0028]
- 10 • **A. L. Lehninger.** *Biochemistry. Worth Publishers*, 1975, 73-75 [0042]
- **Ellman et al.** *Meth. Enzym.*, 1991, vol. 202, 301-336 [0044] [0173]
- 15 • **Noren et al.** *Science*, 1989, vol. 244, 182 [0044] [0173]
- **Ward et al.** *Nature*, 1989, vol. 341, 544-546 [0048]
- **Bird et al.** *Science*, 1988, vol. 242, 423-426 [0048]
- 20 • **Huston et al.** *PNAS (USA)*, 1988, vol. 85, 5879-5883 [0048]
- **Hollinger et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 6444-6448 [0048]
- 25 • **Zapata et al.** *Protein Eng.*, 1995, vol. 8 (10), 1057-1062 [0048]
- **Kohler et al.** *Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0049] [0125]
- **Clackson et al.** *Nature*, 1991, vol. 352, 624-628 [0049] [0133] [0140]
- 30 • **Marks et al.** *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581-597 [0049] [0140]
- **Morrison et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6851-6855 [0050]
- 35 • **Jones et al.** *Nature*, 1986, vol. 321, 522-525 [0051] [0136]
- **Riechmann et al.** *Nature*, 1988, vol. 332, 323-329 [0051]
- **Presta.** *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992, vol. 2, 593-596 [0051]
- 40 • **Vaughan et al.** *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 309-314 [0052]
- **Sheets et al.** *PNAS (USA)*, 1998, vol. 95, 6157-6162 [0052]
- 45 • **Hoogenboom; Winter.** *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 227, 381 [0052] [0140]
- **Marks et al.** *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581 [0052] [0140]
- **Marks et al.** *Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 779-783 [0052] [0069] [0133]
- 50 • **Lonberg et al.** *Nature*, 1994, vol. 368, 856-859 [0052]
- **Morrison.** *Nature*, 1994, vol. 368, 812-13 [0052]
- 55 • **Fishwild et al.** *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 845-51 [0052]
- **Neuberger.** *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 826 [0052]
- **Lonberg; Huszar.** *Intern. Rev. Immunol.*, 1995, vol. 13, 65-93 [0052]
- 60 • **Cole et al.** *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy. Alan R Liss*, 1985, 77 [0052]
- **Boerner et al.** *J. Immunol.*, 1991, vol. 147 (1), 86-95 [0052] [0140]
- 65 • **Kabat et al.** *Sequences of Proteins of Immunological Interest. Public Health Service, National Institutes of Health*, 1991 [0053]
- **Kabat et al.** *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 1991 [0054]

- **Chothia; Lesk.** *J. Mol. Biol.*, 1987, vol. 196, 901-917 [0054]
- **Burton.** *Molec. Immunol.*, 1985, vol. 22, 161-206 [0059] [0061]
- 5 • **Ravetch; Kinet.** *Annu. Rev. Immunol.*, 1991, vol. 9, 457-92 [0065] [0067]
- **Clynes et al.** *PNAS (USA)*, 1998, vol. 95, 652-656 [0065]
- **Daëron.** *Annu. Rev. Immunol.*, 1997, vol. 15, 203-234 [0067]
- 10 • **Capel et al.** *Immunomethods*, 1994, vol. 4, 25-34 [0067]
- **de Haas et al.** *J. Lab. Clin. Med.*, 1995, vol. 126, 330-41 [0067]
- 15 • **Guyer et al.** *J. Immunol.*, 1976, vol. 117, 587 [0067]
- **Kim et al.** *J. Immunol.*, 1994, vol. 24, 249 [0067]
- **Gazzano-Santoro et al.** *J. Immunol. Methods*, 1996, vol. 202, 163 [0068]
- 20 • **Barbas et al.** *Proc Nat. Acad. Sci, USA*, 1994, vol. 91, 3809-3813 [0069]
- **Schier et al.** *Gene*, 1995, vol. 169, 147-155 [0069]
- 25 • **Yelton et al.** *J. Immunol.*, 1995, vol. 155, 1994-2004 [0069]
- **Jackson et al.** *J. Immunol.*, 1995, vol. 154 (7), 3310-9 [0069]
- **Hawkins et al.** *J. Mol. Biol.*, 1992, vol. 226, 889-896 [0069]
- 30 • **Kostelney et al.** *J. Immunol.*, 1992, vol. 148, 1547-1553 [0071]
- **Arakawa et al.** *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269 (45), 27833-27839 [0071]
- 35 • **Radziejewski et al.** *Biochem.*, 1993, vol. 32 (48), 1350 [0071]
- Antibodies, A Laboratory Manual. *Cold-Spring Harbor Laboratory*, 1988 [0074]
- Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs. **Murakami et al.** *The Molecular Basis of Cancer. WB*
40 *Saunders*, 1995, 13 [0083]
- *Agnew. Chem Intl. Ed. Engl.*, 1994, vol. 33, 183-186 [0084]
- **Wilman.** Prodrugs in Cancer Chemotherapy. *Biochemical Society Transactions*, 1986, vol. 14, 375-382
- 45 • Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery. **Stella et al.** *Directed Drug Delivery. Humana Press*,
1985, 247-267 [0087]
- **Klagsbrun; D'Amore.** *Annu. Rev. Physiol.*, 1991, vol. 53, 217-39 [0088] [0089]
- 50 • **Streit; Detmar.** *Oncogene*, 2003, vol. 22, 3172-3179 [0088] [0089]
- **Tonini et al.** *Oncogene*, 2003, vol. 22, 6549-6556 [0088] [0089]
- 55 • **Sato.** *Int. J. Clin. Oncol.*, 2003, vol. 8, 200-206 [0088] [0089] [0114]
- **Kim et al.** *Biochem. J.*, 2000, vol. 346, 603-610 [0095] [0096] [0097] [0105]
- **Yoon et al.** *Mol. Cell Biol*, 2000, vol. 20, 5343-5349 [0095]
- 60 • **Kerten et al.** *J. Biol. Chem.*, 2000, vol. 275, 28488-28493 [0095]
- **Ge et al.** *J. Biol. Chem.*, 2004, vol. 279 (3), 2038-2045 [0096] [0097]
- 65 • **Ge et al.** *J. Lipid Res.*, 2004, vol. 45, 2071-2079 [0096]
- **Mandard et al.** *J. of Biol. Chem.*, 2004, vol. 279 (33), 34411-34420 [0096]

- **Valenzuela et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, vol. 96, 1904-1909 [0097]
- **Folkman; D'Amore.** *Cell*, 1996, vol. 87, 1153-1155 [0097]
- 5 • **Masionpierre et al.** *Science*, 1997, vol. 277, 55-60 [0097]
- **Camenisch et al.** *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277 (19), 17281-17290 [0098]
- **Camenish et al.** *Journal of Biol. Chem.*, 2002, vol. 277 (19), 17281-17290 [0098]
- 10 • **Koishi et al.** *Nat. Genetics*, 2002, vol. 30, 151-157 [0098]
- **Stupack; Cheresch.** *Journal of Cell Science*, 2002, vol. 115, 3729-3738 [0099]
- 15 • **Marshall, J F; Hart, I R.** *Semin. Cancer Biol.*, 1996, vol. 7 (3), 129-38 [0099]
- **Eliceiri, B P; Cheresch, D A.** *Molecular Medicine*, 1998, vol. 4, 741-750 [0099]
- **M. C. Friedlander et al.** *Science*, 1995, vol. 270, 1500-1502 [0099]
- 20 • **Eliceiri; Cheresch.** *Current Opinion in Cell Biology*, 2001, vol. 13, 563-568 [0099]
- **J. W. Smith et al.** *J. Biol. Chem.*, 1990, vol. 265, 12267-12271 [0102]
- 25 • **Le Jan et al.** *American Journal of Pathology*, 2003, vol. 162 (5), 1521-1528 [0103] [0105]
- **S. Le Jan et al.** *Am. J. Pathol.*, 2003, vol. 162 (5), 1521-1528 [0103]
- **Shweiki et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, vol. 92, 768-772 [0103]
- 30 • **Le Jan et al.** *American Journal of Pathology*, 2003, vol. 162 (5), 1521-1528 [0103]
- **Yoon et al.** *Mol. Cell. Biol.*, 2000, vol. 20, 5343-5349 [0105]
- 35 • **Kersten et al.** *J. Biol. Chem.*, 2000, vol. 275, 28488-28493 [0105]
- **Yu et al.** *PNAS USA*, 2005, vol. 102 (5), 1767-1772 [0105]
- **Yoshida et al.** *J. Lipid Res.*, 2002, vol. 43, 1770-1772 [0105]
- 40 • **Wiesner et al.** *J. Endocrinology*, 2004, vol. 180, R1-R6 [0105]
- **Sierra-Honigmann et al.** Biological Action of Leptin as an Angiogenic Factor. *Science*, 1998, vol. 281, 1683-1686 [0105]
- 45 • **Rupnick et al.** Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2002, vol. 99 (16), 10730-10735 [0105]
- 50 • **Fukumura et al.** Paracrine Regulation of Angiogenesis and Adipocyte Differentiation During *In Vivo Adipogenesis*. *Circ. Res.*, 2003, vol. 93, e88-e97 [0105]
- **Goding.** Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. *Academic Press*, 1986, 59 103 [0126]
- **Kozbor.** *J. Immunol.*, 1984, vol. 133, 3001 [0128]
- 55 • **Brodeur et al.** Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications. *Marcel Dekker, Inc*, 1987, 51-63 [0128]
- **Munson; Pollard.** *Anal. Biochem.*, 1980, vol. 107, 220 [0129]
- 60 • **Goding.** Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. *Academic Press*, 1986, 59-103 [0130]
- **McCafferty et al.** *Nature*, 1990, vol. 348, 552-554 [0133]
- 65 • **Marks et al.** *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581 597 [0133]
- **Waterhouse et al.** *Nuc. Acids. Res.*, 1993, vol. 21, 2265-2266 [0133]

ES 2 339 789 T3

- **Morrison et al.** *Proc. Natl Acad Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6851 [0134]
- **Riechmann et al.** *Nature*, 1988, vol. 332, 323-327 [0136]
- 5 • **Verhoeyen et al.** *Science*, 1988, vol. 239, 1534-1536 [0136]
- **Sims et al.** *J. Immunol.*, 1993, vol. 151, 2296 [0137]
- **Chothia et al.** *J. Mol. Biol.*, 1987, vol. 196, 901 [0137]
- 10 • **Carter et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 4285 [0137]
- **Presta et al.** *J. Immunol.*, 1993, vol. 151, 2623 [0137]
- 15 • **Jakobovits et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 2551 [0139]
- **Jakobovits et al.** *Nature*, 1993, vol. 362, 255-258 [0139]
- **Bruggermann et al.** *Year in Immuno.*, 1993, vol. 7, 33 [0139]
- 20 • **Duchosal et al.** *Nature*, 1992, vol. 355, 258 [0139]
- **Hoogenboom et al.** *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 227, 381 [0139]
- 25 • **Marks et al.** *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581-597 [0139]
- **Vaughan et al.** *Nature Biotech.*, 1996, vol. 14, 309 [0139]
- **Johnson, K S.; Chiswell, D J.** *Cur Opin in Struct Biol*, 1993, vol. 3, 564-571 [0140]
- 30 • **Griffith et al.** *EMBO J.*, 1993, vol. 12, 725-734 [0140]
- **Cole et al.** *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy. Alan R. Liss*, 1985, 77 [0140]
- 35 • **Morimoto et al.** *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 1992, vol. 24, 107-117[0141]
- **Brennan et al.** *Science*, 1985, vol. 229, 81 [0141] [0147]
- **Carter et al.** *Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 163-167 [0141]
- 40 • **Millstein et al.** *Nature*, 1983, vol. 305, 537-539 [0143]
- **Traunecker et al.** *EMBO J.*, 1991, vol. 10, 3655-3659 [0143]
- 45 • **Suresh et al.** *Methods in Enzymology*, 1986, vol. 121, 210 [0145]
- **Shalaby et al.** *J. Exp. Med.*, 1992, vol. 175, 217-225 [0148]
- **Kostelny et al.** *J. Immunol.*, 1992, vol. 148 (5), 1547-1553 [0149]
- 50 • **Hollinger et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 6444-6448 [0149]
- **Gruber et al.** *J. Immunol.*, 1994, vol. 152, 5368 [0149]
- 55 • **Tutt et al.** *J. Immunol.*, 1991, vol. 147, 60 [0150]
- **Caron et al.** *J. Exp Med*, 1992, vol. 176, 1191-1195 [0153]
- **Shopes. B. J.** *Immunol.*, 1992, vol. 148, 2918-2922 [0153]
- 60 • **Wolff et al.** *Cancer Research*, 1993, vol. 53, 2560-2565 [0153]
- **Stevenson et al.** *Anti-Cancer Drug Design*, 1989, vol. 3, 219-230 [0153]
- 65 • **Fraker et al.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1978, vol. 80, 49-57 [0157]
- **Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy. CRC Press**, 1989 [0157]

ES 2 339 789 T3

- **Vitetta** *et al. Science*, 1987, vol. 238, 1098 [0159]
- **Chari** *et al. Cancer Research*, 1992, vol. 52, 127-131 [0159] [0164]
- 5 • **Carlsson** *et al. Biochem J.*, 1978, vol. 173, 723-737 [0165]
- **Hinman** *et al. Cancer Research*, 1993, vol. 53, 3336-3342 [0167]
- **Lode** *et al. Cancer Research*, 1998, vol. 58, 2925-2928 [0167]
- 10 • **Remington's Pharmaceutical Sciences**. 1980 [0168] [0214]
- **Epstein** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 3688 [0169]
- 15 • **Hwang** *et al. Proc. Natl Acad Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4030 [0169]
- **Martin** *et al. J. Biol. Chem.*, 1982, vol. 257, 286-288 [0170]
- **Gabizon** *et al. J. National Cancer Inst.*, 1989, vol. 81 (19), 1484 [0170]
- 20 • **Zola**. Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques. *CRC Press, Inc*, 1987, 147-158 [0171]
- **Hunter** *et al. Nature*, 1962, vol. 144, 945 [0171]
- 25 • **David** *et al. Biochemistry*, 1974, vol. 13, 1014 [0171]
- **Pain** *et al. J. Immunol. Meth.*, 1981, vol. 40, 219 [0171]
- **Nygren**. *J. Histochem. And Cytochem.*, 1982, vol. 30, 407 [0171]
- 30 • **T.E. Creighton**. Proteins: Structure and Molecular Properties. *W.H. Freeman & Co*, 1983, 79-86 [0181]
- **Aplin; Wriston**. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 1981, 259-306 [0182]
- 35 • **Hakimuddin** *et al. Arch Biochem. Biophys*, 1987, vol. 259, 52 [0183]
- **Edge** *et al. Anal. Biochem.*, 1981, vol. 118, 131 [0183]
- **Thotakura** *et al. Meth. Enzymol.*, 1987, vol. 138, 350 [0183]
- 40 • **Stinchcomb** *et al. Nature*, 1979, vol. 282, 39 [0195]
- **Jones**. *Genetics*, 1977, vol. 85, 12 [0195]
- 45 • **Van den Berg**. *Biol/Technology*, 1990, vol. 8, 135 [0196]
- **Fleer** *et al. Bio/Technology*, 1991, vol. 9, 968-975 [0196]
- **Reyes** *et al. Nature*, 1982, vol. 297, 598-601 [0202]
- 50 • **Yaniv**. *Nature*, 1982, vol. 297, 17-18 [0203]
- **Graham** *et al. J. Gen Virol*, 1977, vol. 36, 59 [0208]
- 55 • **Urlaub**. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4216 [0208]
- **Mather**. *Biol. Reprod.*, 1980, vol. 23, 243-251 [0208]
- **Mather** *et al. Annals N.Y. Acad Sci.*, 1982, vol. 383, 44-68 [0208]
- 60 • **Ham** *et al. Meth. Enz.*, 1979, vol. 58, 44 [0210]
- **Barnes** *et al. Anal. Biochem.*, 1980, vol. 102, 255 [0210]
- 65 • **Deutscher**. *Methods in Enzymology*, 1990, 182 [0212]
- **Scopes**. Protein Purification: Principles and Practice. *Springer-Verlag*, 1982 [0212]

- **Lindmark et al.** *J. Immunol. Meth.*, 1983, vol. 62, 1-13 [0213]
- **Guss et al.** *EMBO J*, 1986, vol. 5, 1507-1575 [0213]
- 5 • **Carter.** *Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 163-167 [0213]
- *Remington's Pharmaceutical Science.* 1980 [0215]
- **Zamecnik et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, vol. 83, 4143-4146 [0218]
- 10 • **Goldspiel et al.** *clinical Pharmacy*, 1993, vol. 12, 488-505 [0218]
- **Wu; Wu.** *Biotherapy*, 1991, vol. 3, 87-95 [0218]
- 15 • **Tolstoshev.** *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1993, vol. 32, 573-596 [0218]
- **Mulligan.** *Science*, 1993, vol. 260, 926-932 [0218]
- **Morgan; Anderson.** *Ann Rev. Biochem.*, 1993, vol. 62, 191-217 [0218]
- 20 • **May.** *TIBTECH*, 1993, vol. 11, 155-215 [0218]
- *Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons*, 1993 [0218]
- 25 • **Kriegler.** *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual. Stockton Press*, 1990 [0218]
- **Dzau et al.** *Trends in Biotechnology*, 1993, vol. 11, 205-210 [0219]
- **Clowes et al.** *J. Clin. Invest.*, 1994, vol. 93, 644-651 [0219]
- 30 • **Kiem et al.** *Blood*, 1994, vol. 83, 1467-1473 [0219]
- **Salmons; Gunzberg.** *Human Gene Therapy*, 1993, vol. 4, 129-141 [0219]
- **Grossman; Wilson.** *Curr. Opin. in. Genetics and Devel*, 1993, vol. 3, 110-114 [0219]
- 35 • **Bout et al.** *Human-Gene-Therapy*, 1994, vol. 5, 3-10 [0219]
- **Rosenfeld.** *Science*, 1991, vol. 252, 431-434 [0219]
- 40 • **Rosenfeld et al.** *Cell*, 1992, vol. 68, 143-155 [0219]
- **Mastrangeli et al.** *J. Clin Invest.*, 1993, vol. 91, 225-234 [0219]
- **Walsh et al.** *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1993, vol. 204, 289-300 [0219]
- 45 • **Wu et al.** *J. Biol. Chem.*, 1987, vol. 262, 4429-4432 [0220]
- **Wagner et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 3410-3414 [0220]
- 50 • **Anderson et al.** *Science*, 1992, vol. 256, 808-813 [0220]
- *Chemotherapy Service. Williams & Wilkins*, 1992 [0225]
- **Hesser et al.** *Blood*, 2004, vol. 104 (1), 149-158 [0235] [0238] [0241]
- 55 • **Landegren, U.** *J. Immunol. Methods*, 1984, vol. 67, 379-388 [0243]
- **Camenisch et al.** *J. Biol Chem*, 2002, vol. 277 (19), 17281-17290 [0247]
- 60 • **Tomayko; Reynolds.** *Cancer Chemother. Pharmacol*, 1989, vol. 24, 148-154 [0251]
- **Tomayko; Reynolds.** *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1989, vol. 24, 148-154 [0252]
- **Le Jan et al.** *American Journal of Pathology*, 2003, vol. 164 (5), 1521-1528 [0261]
- 65 • **Procopio et al.** *J. Chem.*, 1999, vol. 274, 30196-201 [0265]
- **Landegren.** *J. Immunol. Methods*, 1984, vol. 67, 379-388 [0266]

REIVINDICACIONES

1. Antagonista de proteína 4 de tipo angiopoyetina (ANGPTL4), para su uso en un procedimiento de bloqueo o reducción del crecimiento de tumores o el crecimiento de una célula cancerosa en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento:

a) administrar al tumor o las células cancerosas una cantidad efectiva de un agente contra el cáncer, y

b) administrar al tumor o a las células cancerosas una cantidad efectiva de un antagonista de ANGPTL4,

en donde las cantidades efectivas combinadas bloquean o reducen el crecimiento del tumor o el crecimiento de la célula cancerosa.

2. Antagonista de ANGPTL4, para su uso en un procedimiento de bloqueo o reducción del crecimiento de un tumor o el crecimiento de una célula cancerosa en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento:

administrar al sujeto una composición de combinación que comprende una cantidad efectiva de agente anti-angiogénesis y una cantidad efectiva de un antagonista de proteína 4 de tipo angiopoyetina (ANGPTL4), en el que las cantidades efectivas combinadas bloquean o reducen el crecimiento del tumor o el crecimiento de la células cancerosa.

3. Antagonista de ANGPTL4, para su uso en un procedimiento de bloqueo o reducción de una recaída del crecimiento de un tumor o una recaída del crecimiento de células cancerosas en un sujeto, comprendiendo el procedimiento:

administrar al sujeto una cantidad efectiva del antagonista de ANGPTL4, en donde el sujeto estaba o está al mismo tiempo en tratamiento de cáncer con un agente contra el cáncer; y

en donde la administración de la cantidad efectiva del antagonista de ANGPTL4 bloquea o reduce la recaída del crecimiento del tumor o la recaída del crecimiento de las células cancerosas.

4. Antagonista de ANGPTL4 según la reivindicación 3, en el que el agente contra el cáncer es uno o más agentes quimioterapéuticos.

5. Antagonista de ANGPTL4 según la reivindicación 1 o la reivindicación 3, en el que el agente contra el cáncer cuenta con un agente anti-angiogénesis.

6. Antagonista de ANGPTL4 según la reivindicación 1 o la reivindicación 3, en el que el agente contra el cáncer comprende un agente anti-angiogénesis y en el que el agente anti-angiogénesis es un antagonista de VEGF o inhibidor de anti-VEGF, respectivamente.

7. Antagonista de ANGPTL4 según la reivindicación 6, en el que el antagonista de VEGF o un inhibidor de anti-VEGF es un anticuerpo anti-VEGF.

8. Antagonista de ANGPTL4 según la reivindicación 7, en el que el anticuerpo anti-VEGF es A4.6.1 humanizado.

9. Antagonista de ANGPTL4 según la reivindicación 1 o la reivindicación 3, en el que el antagonista de ANGPTL4 es un anticuerpo anti-ANGPTL4.

10. Antagonista de ANGPTL4 según la reivindicación 1, en el que el antagonista de ANGPTL4 es un anticuerpo anti-ANGPTL4 y en el que el anticuerpo anti-ANGPTL4 se une a ANGPTL4 (184-406).

11. Antagonista de ANGPTL4 según la reivindicación 1 o la reivindicación 3, en el que el antagonista de ANGPTL4 es un anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_5$.

12. Antagonista de ANGPTL4 según la reivindicación 7, 9 u 11, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

13. Antagonista de ANGPTL4 según la reivindicación 1 o la reivindicación 3, en el que el antagonista de ANGPTL4 comprende una molécula de SiARN.

14. Antagonista de ANGPTL4 según la reivindicación 13, en el que la molécula de SiARN es una molécula de ANGPTL4-SiARN.

15. Antagonista de ANGPTL4 según la reivindicación 14, en donde la molécula de ANGPTL4-SiARN marca una secuencia de ADN de un ácido nucleico que codifica ANGPTL4, en el que la secuencia de ADN comprende, al menos GTGGCCAAGCCTGCCGAAGA (SEC ID NO. 3).

16. Antagonista de ANGPTL4 según la reivindicación 1, en el que el procedimiento también comprende administrar al tumor o la célula cancerosa un tercer agente contra el cáncer.
17. Antagonista de ANGPTL4 según la reivindicación 16, en el que el tercer agente contra el cáncer es un agente quimioterapéutico.
18. Antagonista de ANGPTL4 según la reivindicación 16, en el que el tercer agente contra el cáncer es otro inhibidor de la angiogénesis.
19. Antagonista de ANGPTL4 según la reivindicación 1, en el que las etapas de administración (a) y (b) se realizan de forma secuencial.
20. Antagonista de ANGPTL4 según la reivindicación 1, en el que las etapas de administración (a) y (b) se realizan simultáneamente.
21. Antagonista de ANGPTL4 según la reivindicación 1, en el que las etapas de administración (a) y (b) se realizan tanto en forma secuencial como simultáneamente.
22. Antagonista de ANGPTL4 según la reivindicación 1, en el que las etapas de administración se realizan en cualquier orden.
23. Antagonista de ANGPTL4 según la reivindicación 1, en el que el sujeto es un humano.
24. Antagonista de ANGPTL4 según la reivindicación 1, en el que el sujeto tiene una recaída en el crecimiento del tumor o una recaída en el crecimiento de las células cancerosas.
25. Antagonista de ANGPTL4 según la reivindicación 2, o la reivindicación 3, en el que el procedimiento también comprende la administración de un agente adicional, en el que el agente adicional es un agente contra el cáncer.
26. Antagonista de ANGPTL4, para su uso en un procedimiento de bloqueo o reducción del crecimiento de un tumor o el crecimiento de una célula cancerosa, comprendiendo el procedimiento la administración al tumor o a la célula cancerosa de una cantidad efectiva de un antagonista de proteína 4 de tipo angiopoyetina (ANGPTL4), en el que el antagonista de ANGPTL4 es un anticuerpo que se une a ANGPTL4 (184-406) y en el que la cantidad efectiva bloquea o reduce el crecimiento del tumor o el crecimiento de la célula cancerosa.
27. Utilización de un antagonista de ANGPTL4 en la fabricación de un medicamento para su utilización en el tratamiento del cáncer, en el que el antagonista de ANGPTL4 y el tratamiento son como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26.
28. Procedimiento de bloqueo o reducción del crecimiento de una célula cancerosa, no realizada sobre el cuerpo humano o animal, comprendiendo dicho procedimiento:
 - a) administrar a la célula cancerosa una cantidad efectiva de un agente contra el cáncer, y
 - b) administrar a la célula cancerosa una cantidad efectiva de un antagonista de proteína 4 de tipo angiopoyetina (ANGPTL4),en donde las cantidades efectivas combinadas bloquean o reducen el crecimiento de la célula cancerosa.
29. Procedimiento según la reivindicación 28, en el que el agente contra el cáncer es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8 y 12.
30. Procedimiento según la reivindicación 28, en el que el antagonista de ANGPTL4 es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15.
31. Procedimiento según la reivindicación 28, que también comprende la administración de un tercer agente contra el cáncer, según se definen en cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18.
32. Procedimiento según la reivindicación 28, en el que las etapas de administración se realizan como se define en cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22.
33. Procedimiento de bloqueo o reducción del crecimiento de una célula cancerosa, comprendiendo el procedimiento la administración a la célula cancerosa de una cantidad efectiva de un antagonista de proteína 4 de tipo angiopoyetina (ANGPTL4), en el que el antagonista de ANGPTL4 es un anticuerpo que se une a ANGPTL4 (184-406) y en el que la cantidad efectiva bloquea o reduce el crecimiento de la célula cancerosa, no realizándose dicho procedimiento en el cuerpo humano o animal.
34. Composición que comprende un anticuerpo que se une a ANGPTL4 (184-406) y un antagonista de VEGF.

ES 2 339 789 T3

35. Composición que comprende una molécula de ANGPTL4-SiARN, en el que la molécula de ANGPTL4-SiARN marca una secuencia de ADN de un ácido nucleico que codifica ANGPTL4, en el que la secuencia de ADN comprende al menos GTGGCCAAGCCTGCCCCGAAGA (SEC ID NO. 3).

5 36. Equipo que comprende una primera cantidad de un agente anti-angiogénesis, una segunda cantidad de un antagonista de proteína 4r de tipo angiopoyetina (ANGPTL4) y un portador, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, y un contenedor.

10 37. Equipo que comprende una cantidad de un agente anti-angiogénesis y un portador, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable en una primera forma de dosificación de unidad; una cantidad de un antagonista de proteína 4 de tipo angiopoyetina (ANGPTL4) y un portador, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable en una segunda forma de dosificación de unidad, y un contenedor.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

SEQ. ID NO:1:

GCCGAGCTGA GCGGATCCTC ACATGACTGT GATCCGATTC TTTCCAGCGG 50
 CTTCTGCAAC CAAGCGGGTC TTACCCCCCGG TCCTCCGCGT CTCCAGTCCT 100
 CGCACCTGGA ACCCCAACGT CCCCAGAGAGT CCCCGAATCC CCGCTCCCAG 150
 GCTACCTAAG AGGATGAGCG GTGCTCCGAC GGCCGGGGCA GCCCTGATGC 200
 TCTGCGCCGC CACCGCCGTG CTA CTGAGCG CTCAGGGCGG ACCCGTGCAG 250
 TCCAAGTCGC CGCGCTTTGTC GTCTTGGGAC GAGATGAATG TCCTGGCGCA 300
 CGGACTCCTG CAGCTCGGCC AGGGGCTGCG CGAACACGCG GAGCGCACCC 350
 GCAGTCAGCT GAGCGCGCTG GAGCGGCGCC TGAGCGCGTG CCGGTCCGCC 400
 TGTCAGGGAA CCGAGGGGTC CACCGACCTC CCGTTAGCCC CTGAGAGCCG 450
 GGTGGACCCCT GAGGTCCTTC ACAGCCTGCA GACACAACCTC AAGGCTCAGA 500
 ACAGCAGGAT CCAGCAACTC TTCCACAAGG TGGCCCAGCA GCAGCGGCAC 550
 CTGGAGAAGC AGCACCTGCG AATTCAGCAT CTGCAAAGCC AGTTTGGCCT 600
 CCTGGACCAC AAGCACCTAG ACCATGAGGT GGCCAAGCCT GCCCGAAGAA 650
 AGAGGCTGCC CGAGATGGCC CAGCCAGTTG ACCCGGCTCA CAATGTCAGC 700
 CGCCTGCACC GGCTGCCCAG GGATTGCCAG GAGCTGTTCC AGGTTGGGGA 750
 GAGGCAGAGT GGACTATTTG AAATCCAGCC TCAGGGGTCT CCGCCATTTT 800
 TGGTGAAGT CAAGATGACC TCAGATGGAG GCTGGACAGT AATTCAGAGG 850
 CGCCACGATG GCTCAGTGGA CTTCAACCGG CCCTGGGAAG CCTACAAGGC 900
 GGGGTTTGGG GATCCCCACG GCGAGTTCTG GCTGGGTCTG GAGAAGGTGC 950
 ATAGCATCAC GGGGGACCGC AACAGCCGCC TGGCCGTGCA GCTGCGGGAC 1000
 TGGGATGGCA ACGCCGAGTT GCTGCAGTTC TCCGTGCACC TGGGTGGCGA 1050
 GGACACGGCC TATAGCCTGC AGCTCACTGC ACCCGTGGCC GGCCAGCTGG 1100
 GCGCCACCAC CGTCCCACCC AGCGGCCTCT CCGTACCCTT CTCCACTTGG 1150
 GACCAGGATC ACGACCTCCG CAGGGACAAG AACTGCGCCA AGAGCCTCTC 1200

FIG. 1A

TGGAGGCTGG TGGTTTGGCA CCTGCAGCCA TTCCAACCTC AACGGCCAGT 1250
 ACTTCCGCTC CATCCCACAG CAGCGGCAGA AGCTTAAGAA GGAATCTTC 1300
 TGAAGACCT GCGGGGCGG CTACTACCCG CTGCAGGCCA CCACCATGTT 1350
 GATCCAGCCC ATGGCAGCAG AGGCAGCCTC CTAGCGTCCT GGCTGGGCCCT 1400
 GGTCCCAGGC CCACGAAAGA CGGTGACTCT TGGCTCTGCC CGAGGATGTG 1450
 GCCGTTCCCT GCCTGGGCAG GGGCTCCAAG GAGGGGCCAT CTGGAAACTT 1500
 GTGGACAGAG AAGAAGACCA CGACTGGAGA AGCCCCCTTT CTGAGTGCAG 1550
 GGGGGCTGCA TCGTTGCCT CCTGAGATCG AGGCTGCAGG ATATGCTCAG 1600
 ACTCTAGAGG CGTGGACCAA GGGGCATGGA GCTTCACTCC TTGCTGGCCA 1650
 GGGAGTTGGG GACTCAGAGG GACCACTTGG GGCCAGCCAG ACTGGCCTCA 1700
 ATGGCGGACT CAGTCACATT GACTGACGGG GACCAGGGCT TGTGTGGGTC 1750
 GAGAGCGCCC TCATGGTGCT GGTGCTGTTG TGTGTAGGTC CCTGGGGAC 1800
 ACAAGCAGGC GCCAATGGTA TCTGGGCGGA GCTCACAGAG TTCTTGAAT 1850
 AAAAGCAACC TCAGAACAC 1869

FIG. 1B

ES 2 339 789 T3

SEQ. ID NO:2:

Met	Ser	Gly	Ala	Pro	Thr	Ala	Gly	Ala	Ala	Leu	Met	Leu	Cys	Ala	1	5	10	15
Ala	Thr	Ala	Val	Leu	Leu	Ser	Ala	Gln	Gly	Gly	Pro	Val	Gln	Ser	20	25	30	
Lys	Ser	Pro	Arg	Phe	Ala	Ser	Trp	Asp	Glu	Met	Asn	Val	Leu	Ala	35	40	45	
His	Gly	Leu	Leu	Gln	Leu	Gly	Gln	Gly	Leu	Arg	Glu	His	Ala	Glu	50	55	60	
Arg	Thr	Arg	Ser	Gln	Leu	Ser	Ala	Leu	Glu	Arg	Arg	Leu	Ser	Ala	65	70	75	
Cys	Gly	Ser	Ala	Cys	Gln	Gly	Thr	Glu	Gly	Ser	Thr	Asp	Leu	Pro	80	85	90	
Leu	Ala	Pro	Glu	Ser	Arg	Val	Asp	Pro	Glu	Val	Leu	His	Ser	Leu	95	100	105	
Gln	Thr	Gln	Leu	Lys	Ala	Gln	Asn	Ser	Arg	Ile	Gln	Gln	Leu	Phe	110	115	120	
His	Lys	Val	Ala	Gln	Gln	Gln	Arg	His	Leu	Glu	Lys	Gln	His	Leu	125	130	135	
Arg	Ile	Gln	His	Leu	Gln	Ser	Gln	Phe	Gly	Leu	Leu	Asp	His	Lys	140	145	150	
His	Leu	Asp	His	Glu	Val	Ala	Lys	Pro	Ala	Arg	Arg	Lys	Arg	Leu	155	160	165	
Pro	Glu	Met	Ala	Gln	Pro	Val	Asp	Pro	Ala	His	Asn	Val	Ser	Arg	170	175	180	
Leu	His	Arg	Leu	Pro	Arg	Asp	Cys	Gln	Glu	Leu	Phe	Gln	Val	Gly	185	190	195	
Glu	Arg	Gln	Ser	Gly	Leu	Phe	Glu	Ile	Gln	Pro	Gln	Gly	Ser	Pro	200	205	210	
Pro	Phe	Leu	Val	Asn	Cys	Lys	Met	Thr	Ser	Xaa	Gly	Gly	Trp	Thr	215	220	225	
Val	Ile	Gln	Arg	Arg	His	Asp	Gly	Ser	Val	Asp	Phe	Asn	Arg	Pro	230	235	240	

FIG. 2A

Trp	Glu	Ala	Tyr	Lys	Ala	Gly	Phe	Gly	Asp	Pro	His	Gly	Glu	Phe	245	250	255
Trp	Leu	Gly	Leu	Glu	Lys	Val	His	Ser	Ile	Thr	Gly	Asp	Arg	Asn	260	265	270
Ser	Arg	Leu	Ala	Val	Gln	Leu	Arg	Asp	Trp	Asp	Gly	Asn	Ala	Glu	275	280	285
Leu	Leu	Gln	Phe	Ser	Val	His	Leu	Gly	Gly	Glu	Asp	Thr	Ala	Tyr	290	295	300
Ser	Leu	Gln	Leu	Thr	Ala	Pro	Val	Ala	Gly	Gln	Leu	Gly	Ala	Thr	305	310	315
Thr	Val	Pro	Pro	Ser	Gly	Leu	Ser	Val	Pro	Phe	Ser	Thr	Trp	Asp	320	325	330
Gln	Asp	His	Asp	Leu	Arg	Arg	Asp	Lys	Asn	Cys	Ala	Lys	Ser	Leu	335	340	345
Ser	Gly	Gly	Trp	Trp	Phe	Gly	Thr	Cys	Ser	His	Ser	Asn	Leu	Asn	350	355	360
Gly	Gln	Tyr	Phe	Arg	Ser	Ile	Pro	Gln	Gln	Arg	Gln	Lys	Leu	Lys	365	370	375
Lys	Gly	Ile	Phe	Trp	Lys	Thr	Trp	Arg	Gly	Arg	Tyr	Tyr	Pro	Leu	380	385	390
Gln	Ala	Thr	Thr	Met	Leu	Ile	Gln	Pro	Met	Ala	Ala	Glu	Ala	Ala	395	400	405
Ser															406		

FIG._2B

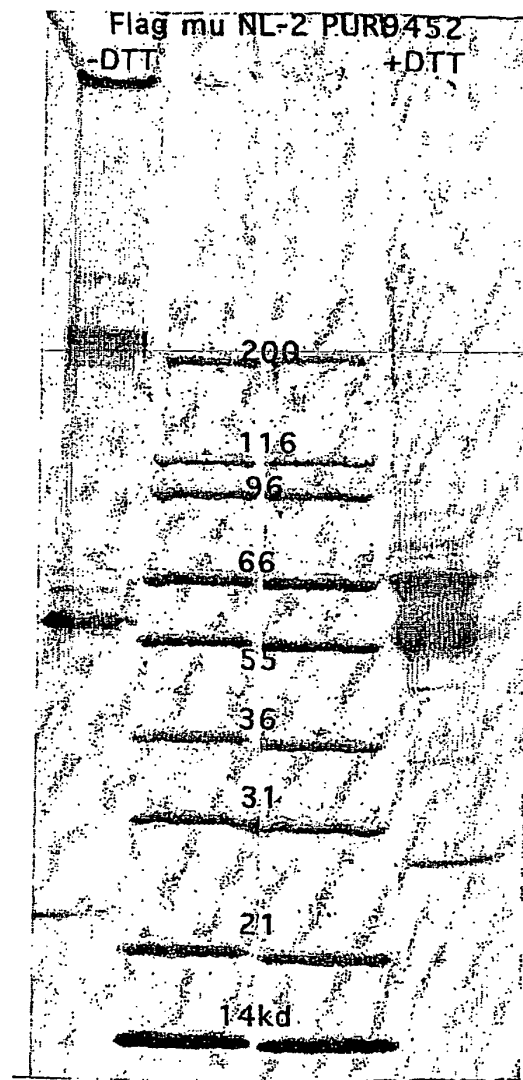


FIG._3A

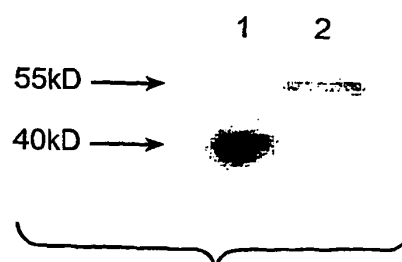


FIG._3B

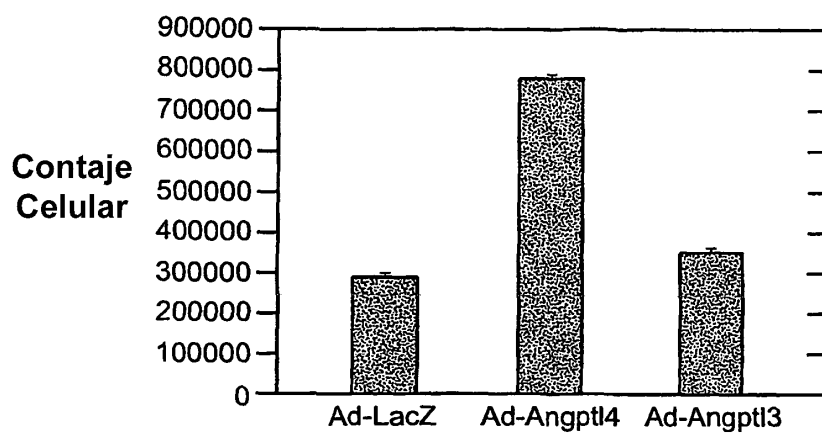


FIG. 4A

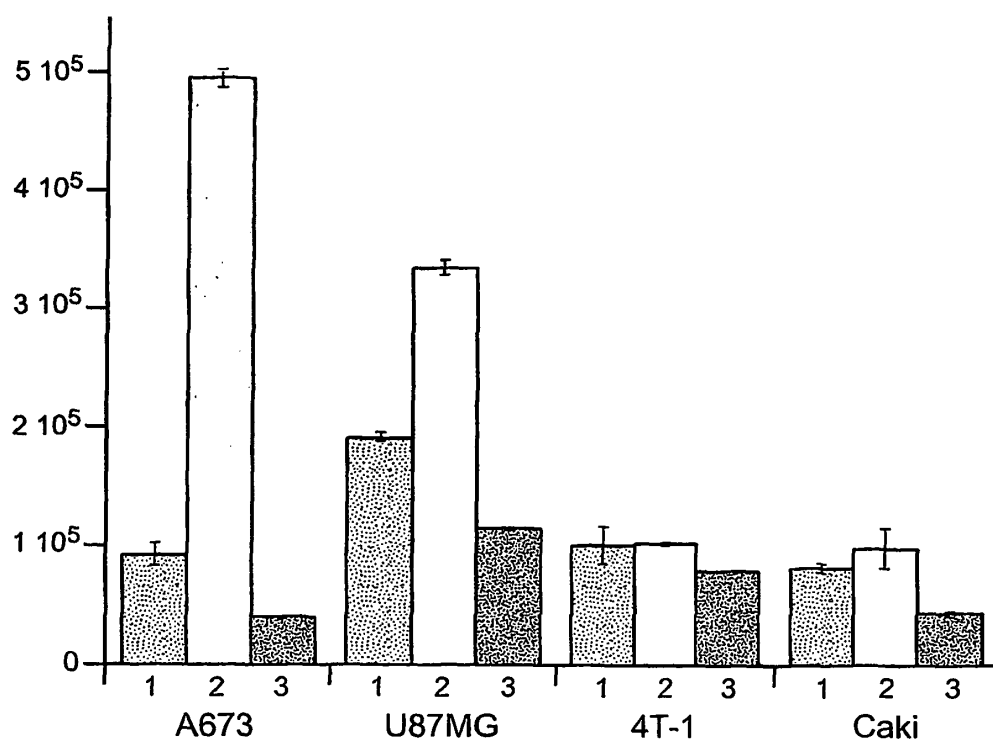


FIG. 4B

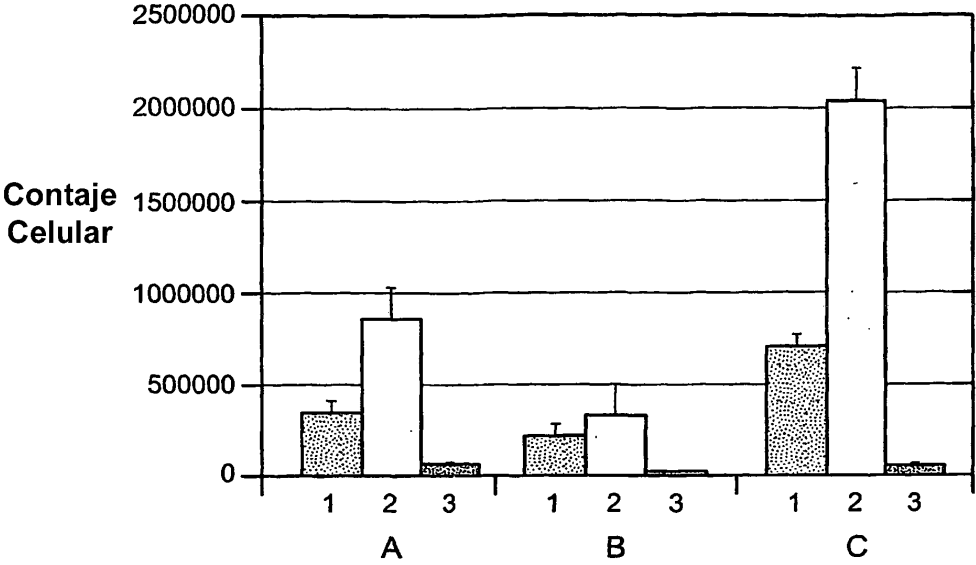


FIG. 4C

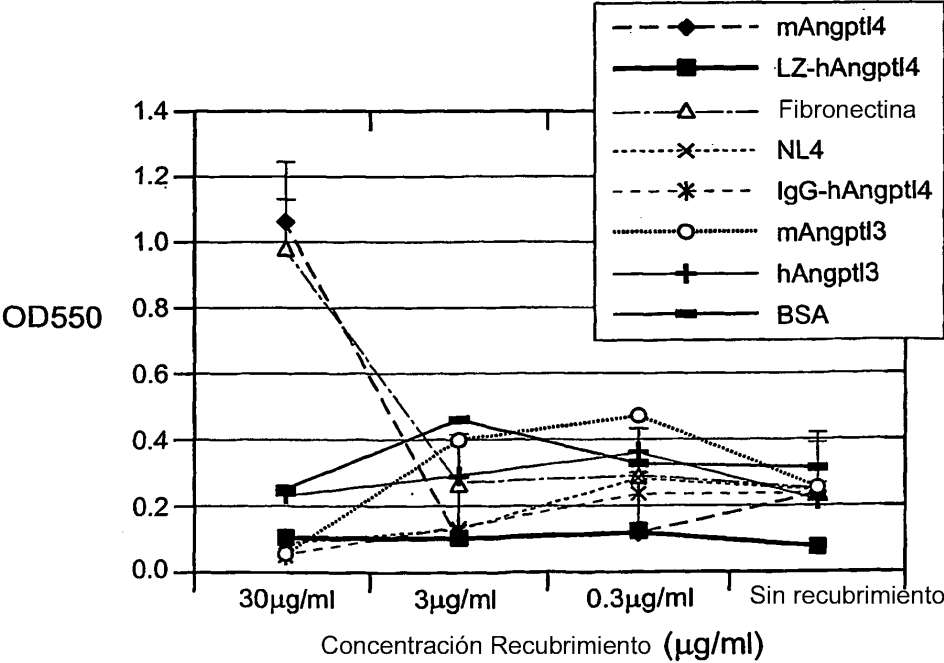
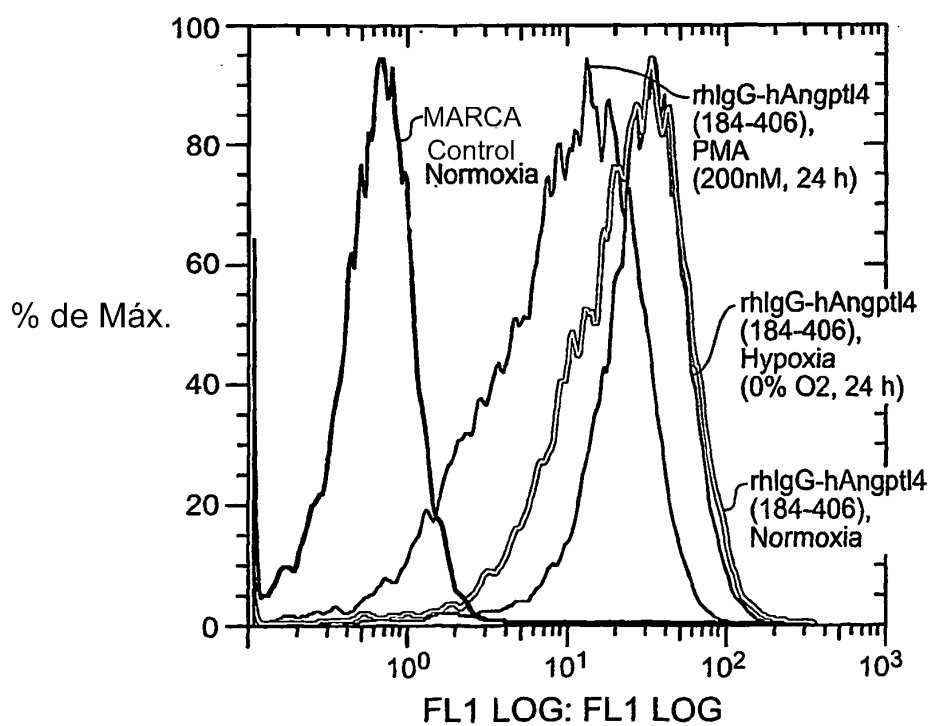
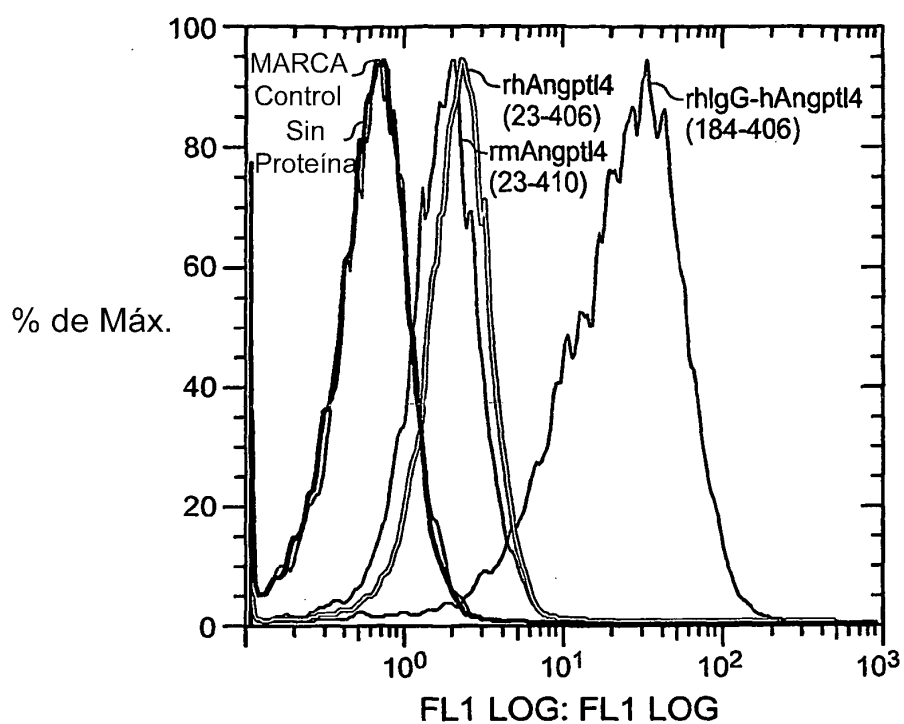


FIG. 5



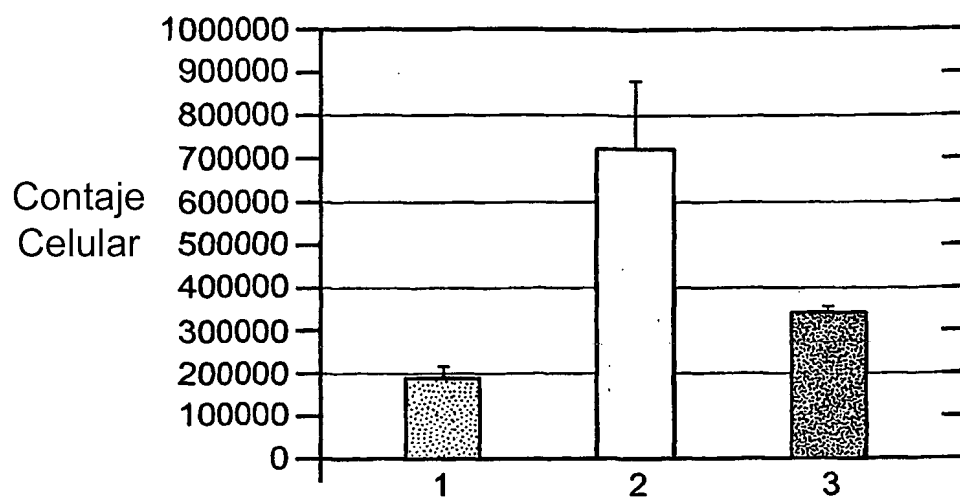


FIG. 7A

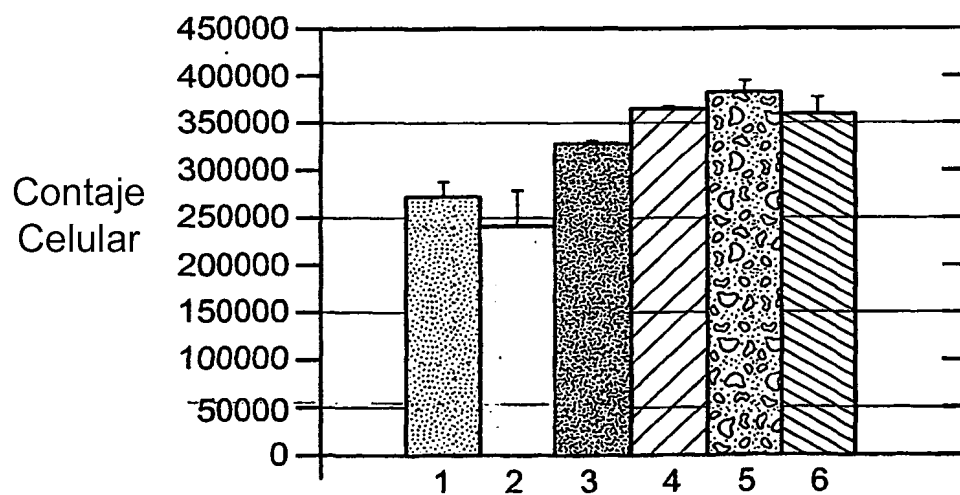


FIG. 7B

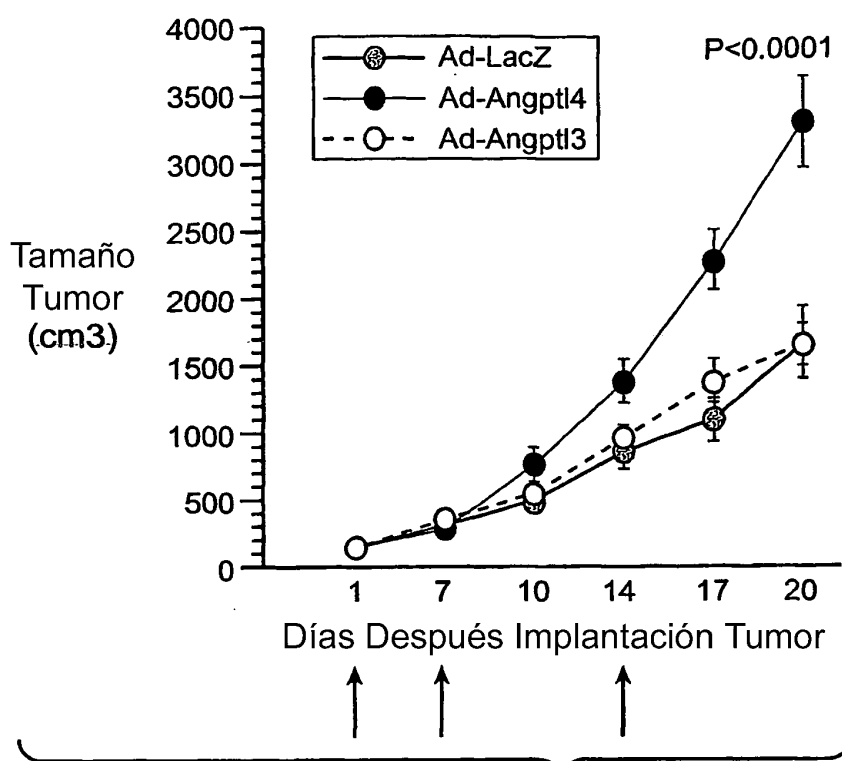


FIG._8A

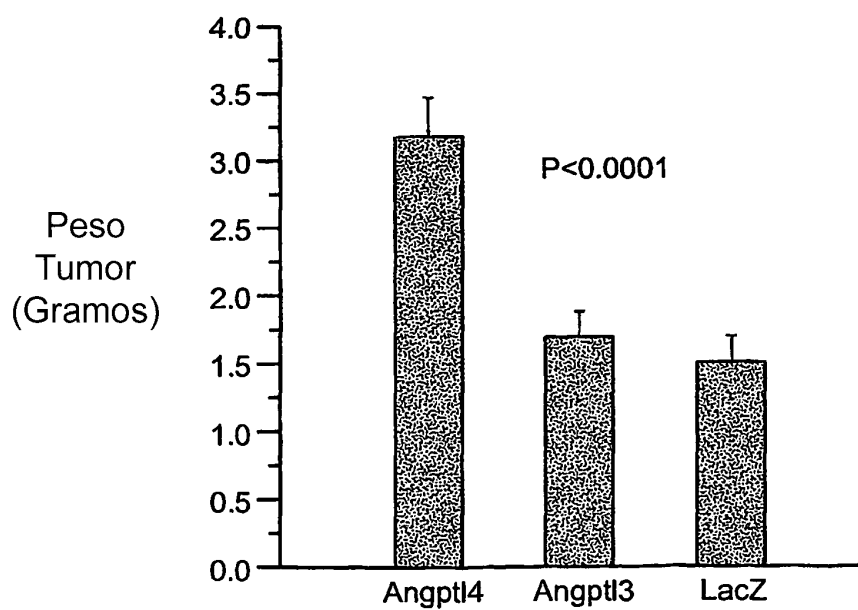


FIG._8B

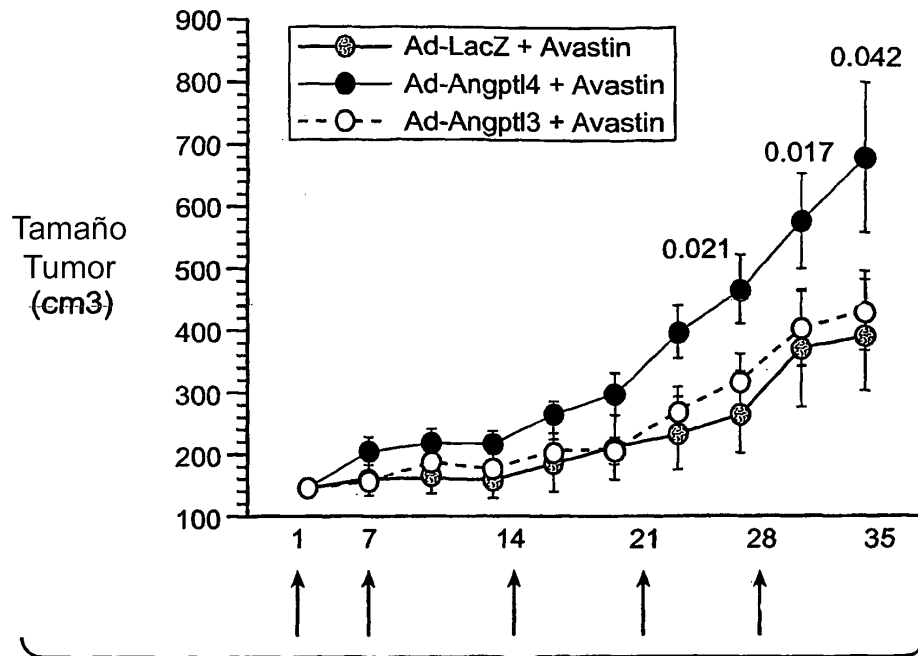


FIG._8C

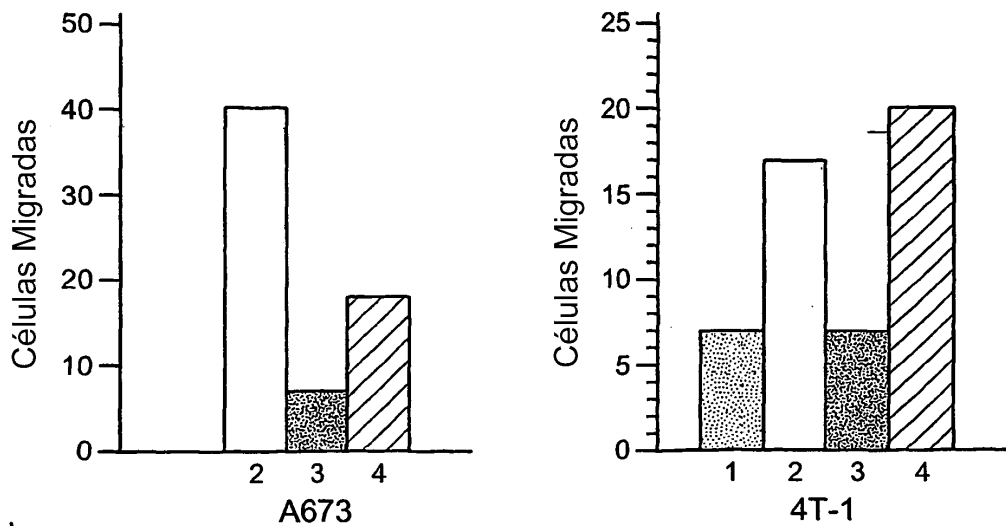


FIG._9

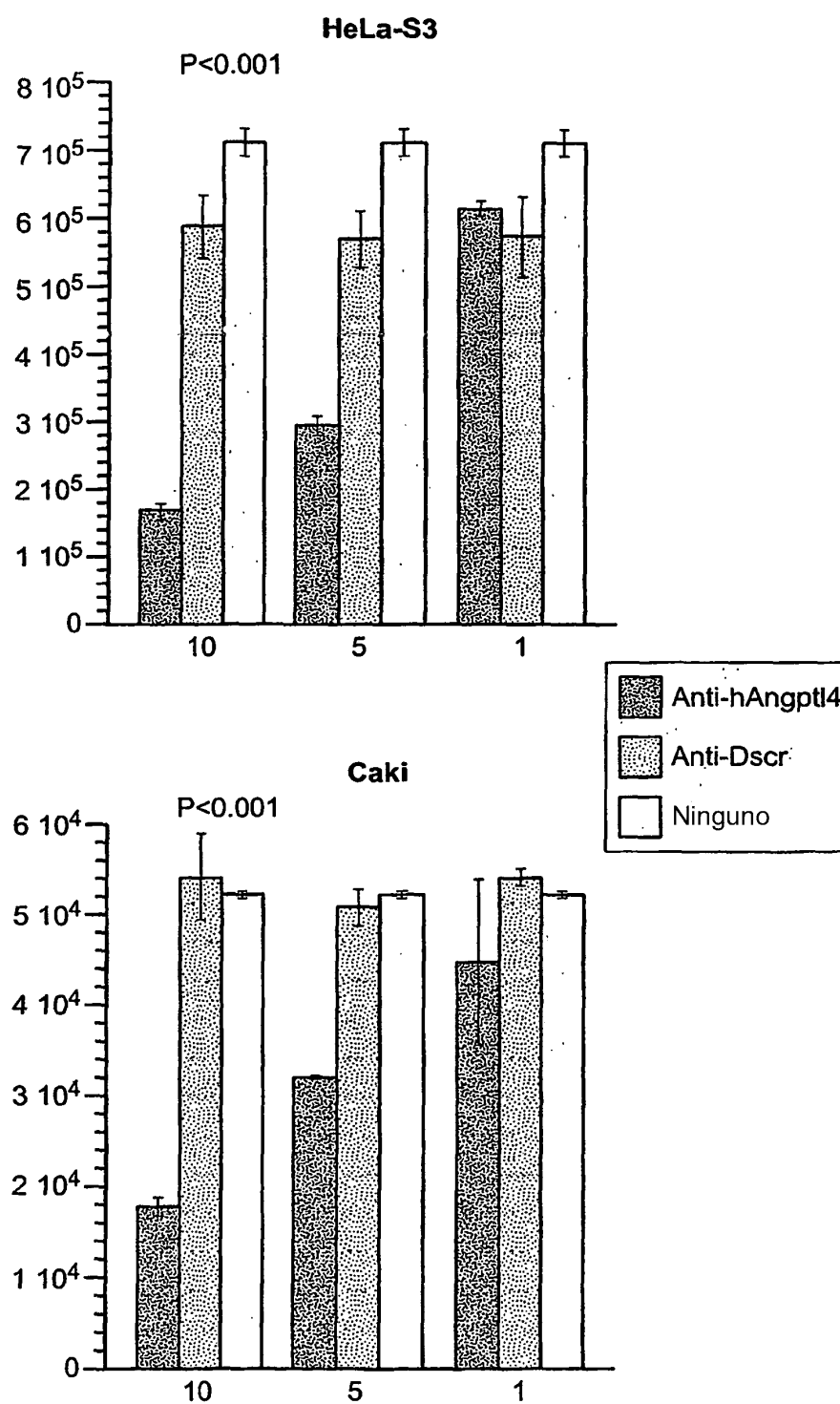


FIG. 10A

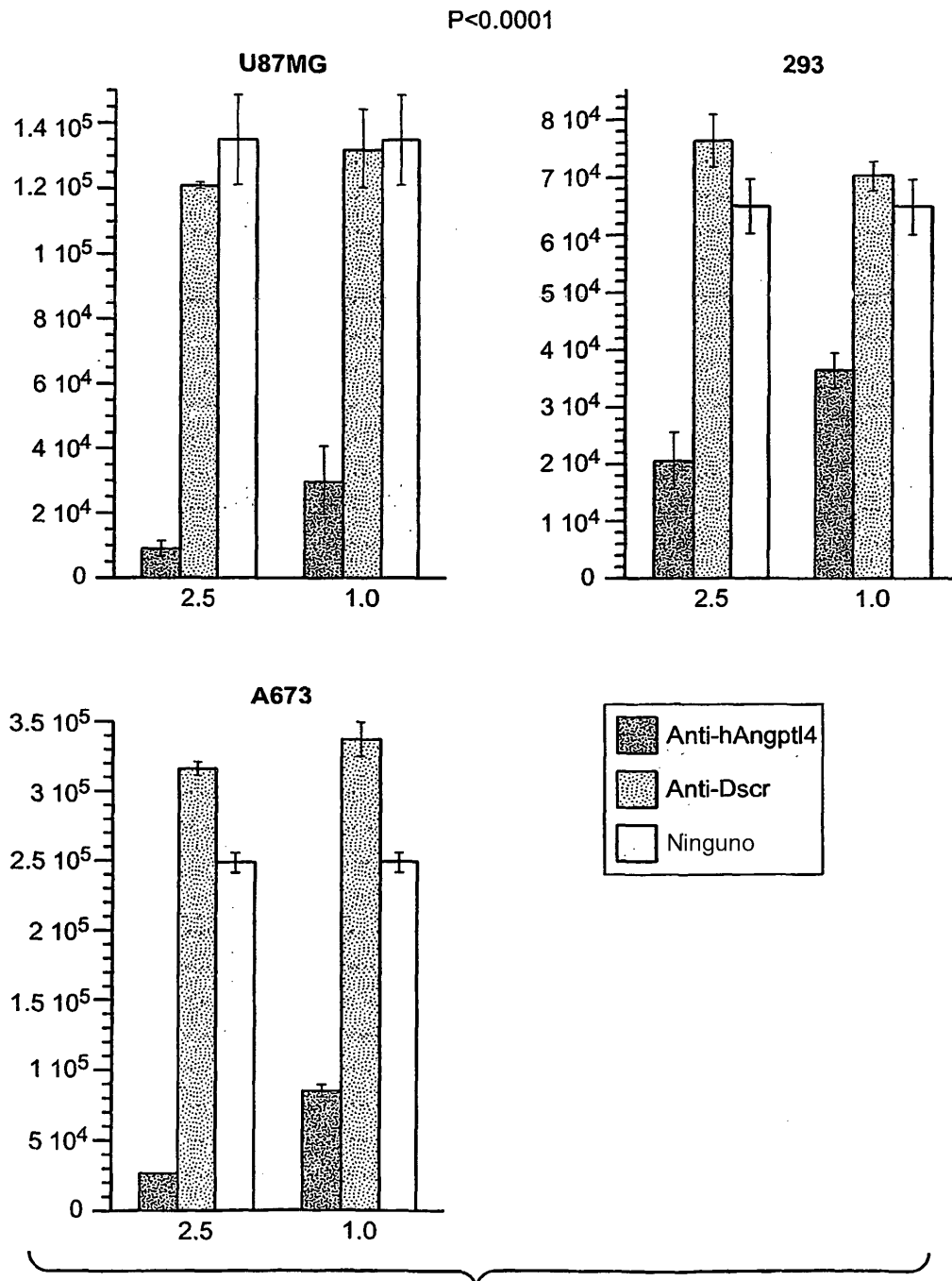


FIG. 10B

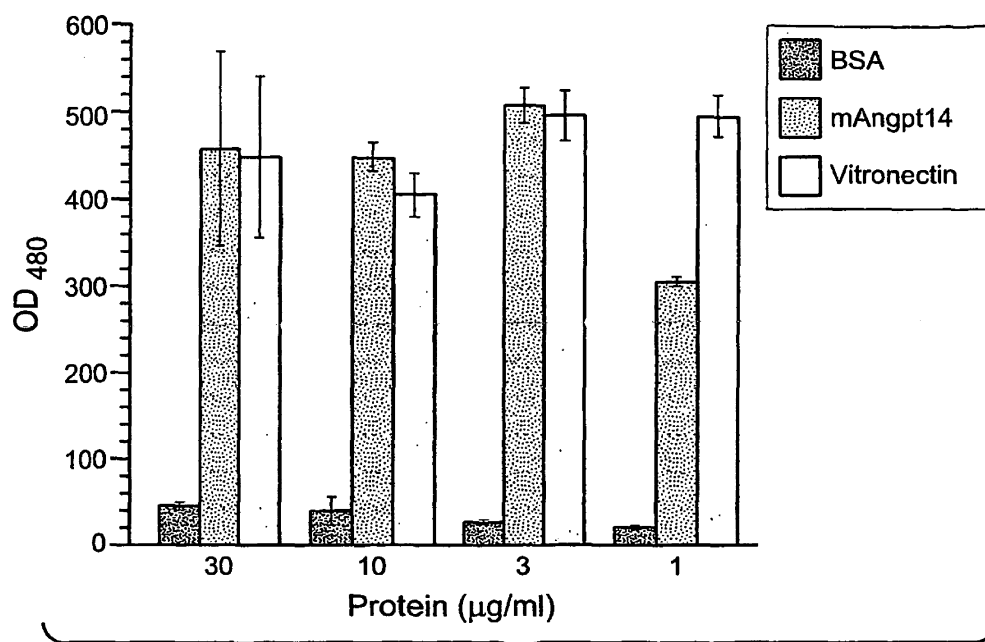


FIG. 11

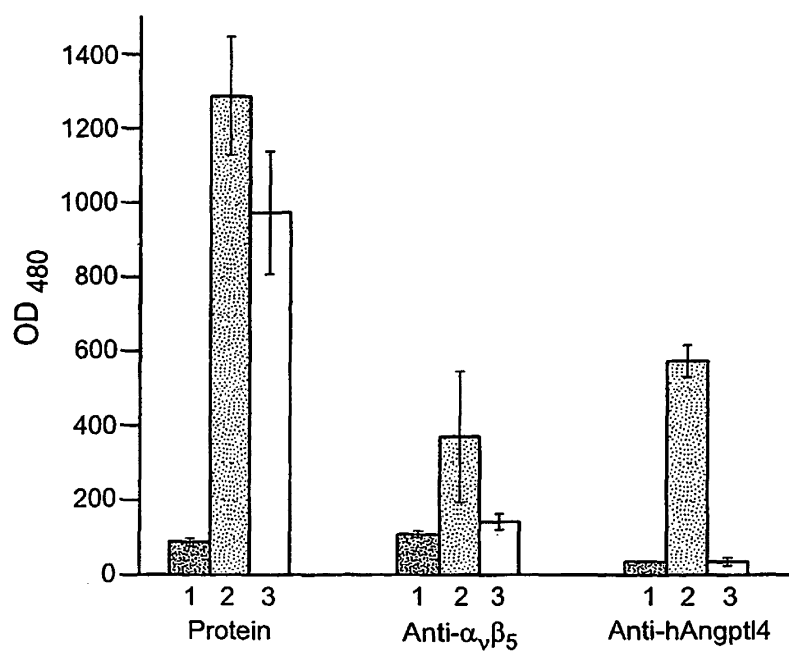


FIG. 12

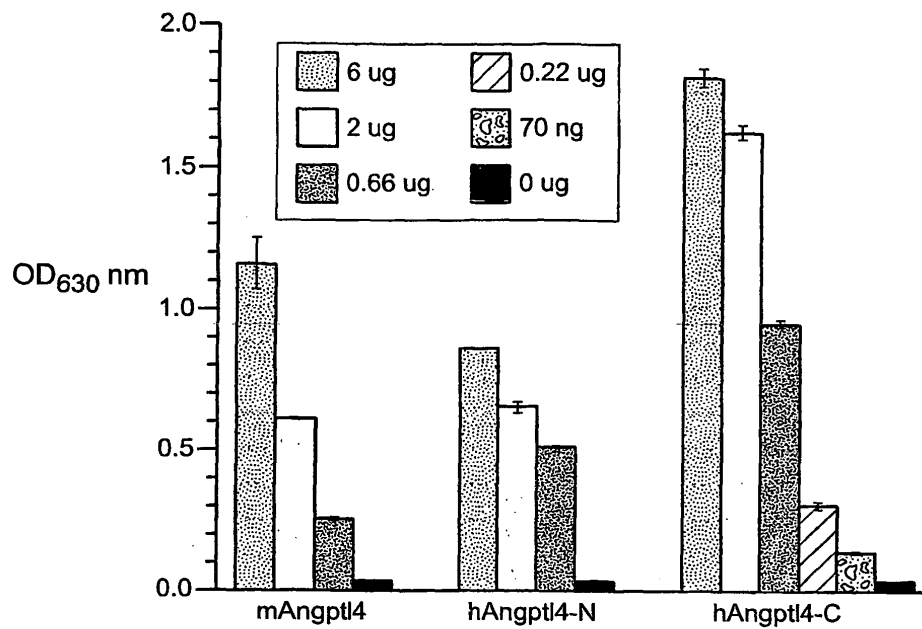


FIG. 13A

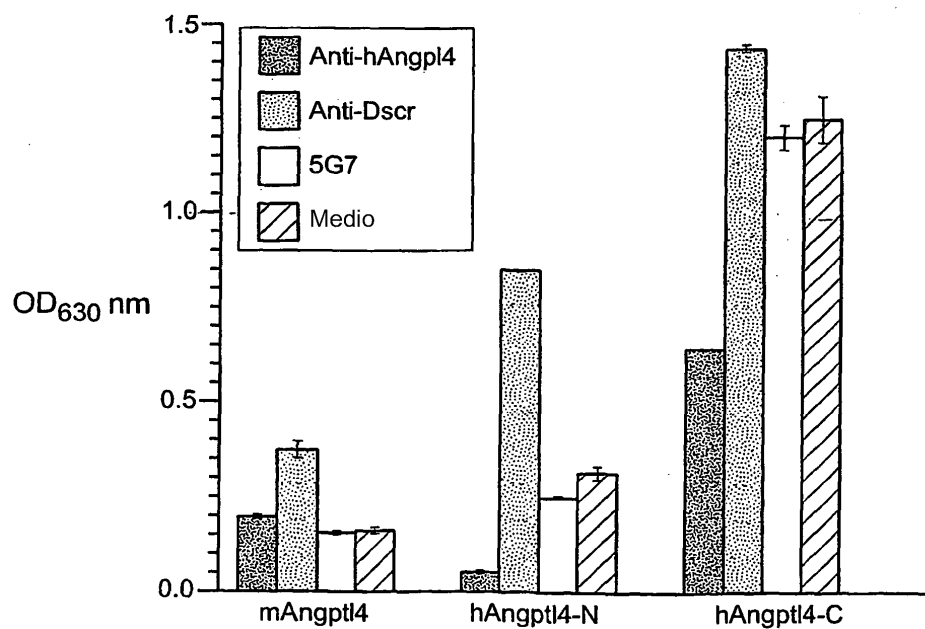


FIG. 13B

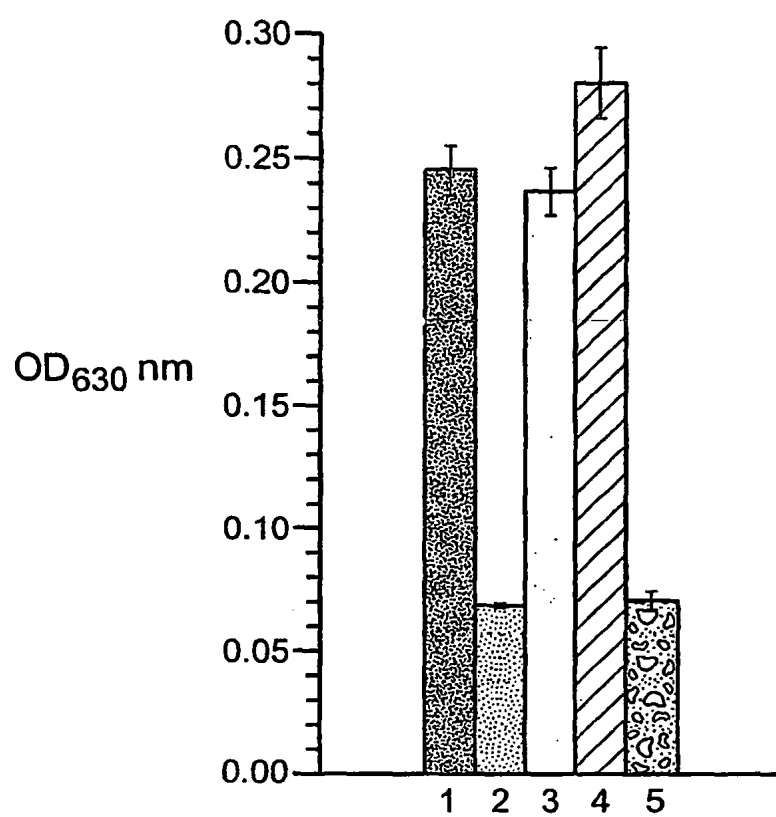


FIG._13C