



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 323 938**

51 Int. Cl.:

<b>C12N 15/13</b> (2006.01)	<b>C07K 16/28</b> (2006.01)
<b>C12N 5/20</b> (2006.01)	<b>A61K 39/395</b> (2006.01)
<b>A61P 35/00</b> (2006.01)	<b>A61P 37/00</b> (2006.01)
<b>A61P 9/00</b> (2006.01)	<b>A61P 27/00</b> (2006.01)
<b>A61P 19/02</b> (2006.01)	<b>C12N 15/63</b> (2006.01)
<b>A61K 48/00</b> (2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01922997 .0**

96 Fecha de presentación : **30.03.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1268799**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2003**

54

Título: **Anticuerpos antagonistas contra cadherina VE sin efectos adversos sobre la permeabilidad vascular.**

30

Prioridad: **31.03.2000 US 540967**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**28.07.2009**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**28.07.2009**

73

Titular/es: **IMCLONE SYSTEMS, Inc.**  
**180 Varick Street**  
**New York, New York 10014, US**

72

Inventor/es: **Liao, Fang;**  
**Hicklin, Daniel, J. y**  
**Bohlen, Peter**

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 323 938 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos antagonistas contra cadherina VE sin efectos adversos sobre la permeabilidad vascular.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a anticuerpos antagonistas de cadherina VE que inhiben la formación de nuevas uniones adherentes sin alterar la integridad de las uniones existentes. Dichos anticuerpos son de utilidad para prevenir la angiogénesis en una variedad de afecciones de enfermedades, que incluyen, por ejemplo, prevenir la neovascularización de tumores. Estos anticuerpos son también de utilidad para tratar trastornos de proliferación de células endoteliales

**Antecedentes de la invención**

Muchas enfermedades están asociadas a la proliferación anormal de los vasos sanguíneos. El proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos se denomina angiogénesis. En condiciones normales o no patológicas, la angiogénesis se produce en condiciones bien definidas, tales como en la curación de heridas, como respuesta a la isquemia y durante el desarrollo embrionario y fetal. Sin embargo, la angiogénesis persistente o descontrolada puede provocar una variedad de estados de enfermedad o afecciones y, en el caso de los tumores sólidos, puede ser una condición necesaria para mantener el estado de enfermedad. Por ejemplo, la angiogénesis se produce en enfermedades neoplásicas, en particular con los tumores sólidos, en enfermedades autoinmunitarias, en enfermedades del colágeno vascular tales como artritis reumatoide, y en ciertas afecciones oftalmológicas tales como retinopatía diabética, fibroplasia retrolenticular y glaucoma neovascular. Una estrategia terapéutica para el tratamiento de dichas enfermedades sería restringir, reducir o eliminar el aporte sanguíneo a las células o tejidos enfermos. Por ejemplo, los tumores sólidos de más de unos pocos milímetros experimentan neovascularización sin la cual sería imposible el crecimiento ulterior, de forma que al inhibir la formación de vasos sanguíneos se limitará el tamaño del tumor.

Algunas estrategias de tratamiento han tratado de limitar el aporte sanguíneo del tumor ocluyendo los vasos sanguíneos que riegan el tumor. Para dicho tratamiento, debe conocerse la localización del tumor y el tumor debe ser accesible. Así, un procedimiento de tratamiento que no dependiera de conocer la localización ni de la accesibilidad al área de interés sería valioso y permitiría la administración sistémica de un agente terapéutico contra la angiogénesis que pueda dirigirse específicamente al área de la enfermedad.

Debido al papel que juega la angiogénesis en el desarrollo de la enfermedad, hay un interés sustancial en desarrollar inhibidores de la angiogénesis, especialmente cuando las terapias actuales no son óptimas. Dado que las células endoteliales son parte integral de la formación de los vasos sanguíneos, un inhibidor específico de dichas células sería ventajoso para inhibir la angiogénesis, con la condición, por supuesto, de que la toxicidad asociada al inhibidor sea mínima. Una diana de interés particular es la cadherina específica de células endoteliales, cadherina VE, que forma uniones adherentes intercelulares.

Las cadherinas son una familia de moléculas de adhesión entre células que están implicadas en la formación de contactos intercelulares específicos (Takeichi, Ann. Rev. Biochem. 59: 237-252 (1990); Geiger y Ayalon, Ann Rev. Cell Biol. 8: 302-332 (1992); Uemura, Cell 93: 1095-1098 (1998)). Se ha identificado o caracterizado un número de miembros. Las cadherinas son glucoproteínas transmembrana monocatenarias con pesos moleculares de 120-140 kD. Los miembros de esta familia muestran interacciones homófilas dependientes de calcio y son responsables del reconocimiento y adhesión intercelulares selectivos, que son necesarios para situar los diferentes tipos celulares en sus lugares correspondientes durante el desarrollo de los órganos. Las cadherinas también desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la integridad de las estructuras multicelulares. Durante la morfogénesis embrionaria, la expresión de diversos miembros de la familia de las cadherinas está regulada espacial y temporalmente, facilitando el ensamblado ordenado de diversos tipos celulares en estructuras funcionales (Takeichi, Ann. Rev. Biochem. 59: 237-252 (1990)).

Los miembros de la familia de las cadherinas tienen características estructurales típicas, y comparten una considerable homología entre las secuencias (43-58%). Su región extracelular habitualmente contiene 5 dominios que se repiten de aproximadamente 110 aminoácidos. Se ha demostrado que el dominio del extremo N es importante en la interacción intercelular homotípica tal y como se demuestra mediante experimentos con quimeras moleculares, anticuerpos monoclonales e inhibidores peptídicos (Nose y cols., Cell 54: 993-1001 (1988)). Se han elucidado las estructuras tridimensionales de los dominios del extremo N de cadherina N y de cadherina E (Shapiro y cols., Nature 374: 327-337 (1995); Overduin y cols., Science 267: 386-389 (1995); Nagar y cols., Nature 380: 360-364 (1996)). Por consiguiente, se cree que las cadherinas forman dímeros soportados por elementos de tipo cremallera y posiblemente por enlaces disulfuro. La corta porción intracelular de las cadherinas es su región más conservada y desempeña un papel fundamental en la función clásica de las cadherinas al anclar las cadherinas al citoesqueleto y desempeñar funciones de señalización a través de la fosforilación de las cadherinas (Véase, Fig. 1).

Se ha demostrado que la cadherina VE (o cadherina-5) está situada en los enlaces intercelulares (uniones adherentes) en los contactos intercelulares (Lampugnani y cols., J. Cell. Biol. 118: 1511-1522 (1992); Breviario y cols., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 15: 1229-1239 (1995); Breier y cols., Blood 87: 630-641 (1996); Lampugnani y cols., J. Cell Biol. 129: 203-217 (1995)). Numerosas observaciones experimentales sugieren que esta cadherina está

implicada en diversos aspectos de la biología vascular referida a la angiogénesis, que incluyen el ensamblaje de células endoteliales en forma de estructuras tubulares (Bach y cols., *Experimental Cell Research* 238: 324-334 (1998)). Por ejemplo, se ha demostrado que la permeabilidad vascular inducida por trombina está asociada a desacoplamiento de las uniones adherentes endoteliales (Rabiet y cols., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16: 488-496 (1996); Dejana, J. Clin Invest. 100: S7-10. (1997); Dejana y cols., *FASEB J.*, 9: 910-918 (1995); Dejana y cols., *Ann N Y Acad Sci.* 811: 36-43 (1997); Gotsch y cols., *J. Cell. Sci.* 110: 583-588 (1997); Kevil y cols., *J. Biol. Chem.* 273: 15099-15103 (1998); Corada y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 9815-9820 (1999)). La cadherina VE y su fragmento del extremo N inhiben el crecimiento dependiente de la densidad (Yap y cols., *J. Cell Biol.* 141: 779-789 (1998); Caveda y cols., *J. Clin. Invest.* 98: 886-893 (1996)) y la migración (Breviario y cols., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15: 1229-1239 (1995)) de las células endoteliales. En otros experimentos, se demostró que la cadherina VE confiere propiedades adherentes a las células transfectadas (Breviario y cols., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15: 1229-1239 (1995); Breier y cols., *Blood* 87: 630-641 (1996); Ali y cols., *Microcirculation* 4: 267-277 (1997)), y se ha demostrado un papel fundamental de la cadherina VE en la formación de vasos sanguíneos en ratones deficientes en cadherina VE. En estos ratones, el muy deficiente ensamblaje de las estructuras vasculares provoca un fenotipo letal en fase embrionaria (Vittet y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 6273-6278 (1997); Faure y cols., *Development* 128: 2093-2102 (1999); Carmeliet y cols., *Cell* 98: 147-157 (1999)). Estos hallazgos validan con fuerza que la cadherina VE es una diana farmacológica atractiva para inhibir la neovascularización.

La publicación de F. Liao y cols.: "Identification of antibody-based VE-cadherin antagonists for the application of contra angiogenesis therapy", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 41:645 (2000), describe dos anticuerpos monoclonales contra cadherina VE que inhiben la angiogénesis al bloquear la formación de nuevas uniones en la vasculatura tumoral sin alterar las uniones existentes del endotelio normal. Este trabajo no describe el epítipo de la cadherina VE.

El documento US 5 597 725 describe cadherinas novedosas denominadas cadherinas-4 a -12 y anticuerpos monoclonales capaces de unirse específicamente a estas cadherinas. Se describe que el anticuerpo producido por el híbrido-ma denominado 64G11F que se depositó con el número de acceso de ATCC HB 11527, reacciona con el dominio 1 extracelular de cadherina-5, sin embargo, no se identificó la porción de su epítipo.

Tampoco se han descrito sitios de epítipos de cadherina VE en los artículos de Breviario y cols. y de Bach y cols. que se citan anteriormente.

F.R. Haselton y R.L. Heimark describe en su publicación "Role of cadherins 5 and 13 in the aortic endothelial barrier", *Journal of Cellular Physiology* 171:243-251 (1997), un anticuerpo monoclonal (Mab 9H7) que se une al dominio externo de cadherina-5, sin embargo, no se han identificado sitios de epítipos.

Antes de la presente invención, las tentativas de usar anticuerpos antagonistas contra cadherina VE para prevenir la angiogénesis se han visto limitadas por la toxicidad del anticuerpo para la vasculatura normal. Por ejemplo, la administración de ciertos anticuerpos contra cadherina en cantidades suficientes para prevenir o inhibir la angiogénesis han provocado la alteración de la integridad de la vasculatura normal con los concomitantes síndromes de filtración vascular, hemorragia y muerte. Por ejemplo, el anticuerpo contra cadherina VE 19E6 provoca una mayor permeabilidad vascular pulmonar porque el anticuerpo altera las uniones celulares mediadas por cadherina VE existentes, además de prevenir la formación de nuevas uniones adherentes mediada por cadherina VE. La presente invención ahora aborda y proporciona anticuerpos antagonistas contra cadherina VE dirigidos contra sitios particulares de cadherina VE y que superan dichos problemas.

## Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que es un antagonista de cadherina VE. El anticuerpo y fragmentos de anticuerpo de la invención son capaces de unirse específicamente a una molécula que se selecciona a partir del grupo constituido por

- una cadherina VE en un sitio que está entre los primeros 15 aminoácidos del extremo N del dominio 1 de la cadherina VE,

- y un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. N.º: 2 (DWIWNOMHIDEKNE), en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención es capaz de inhibir la formación de uniones adherentes mediada por cadherina VE *in vitro*, pero no produce ningún efecto significativo ni sustancial sobre la permeabilidad paracelular *in vitro*. Dichos anticuerpos y fragmentos de anticuerpo no ejercen ningún efecto significativo ni sustancial sobre la permeabilidad vascular *in vivo* y son sustancialmente no tóxicos cuando se administran a un animal o mamífero. Además, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo son capaces de inhibir la angiogénesis *in vivo* o *in vitro* así como la metástasis tumoral. Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de la invención actúan inhibiendo la formación de nuevas uniones adherentes sin alterar las uniones adherentes existentes. Los anticuerpos preferidos de la invención son anticuerpos monoclonales. Del mismo modo, los fragmentos de anticuerpo preferidos son de anticuerpos monoclonales. En una realización más preferida, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal de rata contra cadherina VE murina E4B9 producido por el híbrido-ma depositado en la American Type Culture Collection (ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 EE. UU.) el 31 de marzo de 2000, y al que se ha asignado el número de acceso PTA-1618. El mamífero preferido de la invención es un ser humano.

Los anticuerpos y o fragmentos de anticuerpos de la presente invención pueden ser un anticuerpo monocatenario, humanizado, quimérico, biespecífico o fusionado a un polipéptido heterólogo.

Otro aspecto de la invención se refiere a un hibridoma que produce los anticuerpos monoclonales de la invención, en particular el hibridoma ATCC PTA-1618.

De acuerdo con un aspecto adicional, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención mezclado con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto más de la invención se refiere al uso de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo para preparar composiciones farmacéuticas para el tratamiento de mamíferos durante un tiempo y en una cantidad eficaz para inhibir la angiogénesis.

Otro aspecto adicional del uso de los anticuerpos y fragmento de anticuerpo para la inhibición de la metástasis tumoral en mamíferos mediante las composiciones farmacéuticas de la invención en mamíferos durante un tiempo y en una cantidad eficaz para inhibir la metástasis de un tumor.

Además, la invención incluye el uso anterior para tratar trastornos de proliferación celular asociados a la vascularización en mamíferos mediante la composición farmacéutica de la invención en una cantidad eficaz para inhibir la proliferación de células endoteliales sin alterar la vasculatura normal. Los trastornos de proliferación celular, incluyen pero sin limitación, trastornos proliferativos de los vasos sanguíneos, trastornos fibróticos, angiogénesis, desarrollo tumoral, metástasis tumoral, artritis reumatoide, y degeneración muscular senil.

Otra realización más de la invención se refiere al uso de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo para preparar composiciones farmacéuticas para reducir o inhibir la vasculatura tumoral en mamíferos. Las composiciones de la invención se administran a un mamífero en una cantidad eficaz para inhibir la formación de vasos sanguíneos sin afectar adversamente a la vasculatura existente, es decir, para eliminar o reducir o restringir sustancialmente el flujo sanguíneo a un tumor sin afectar adversamente a la vasculatura existente.

La invención también proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia codificante del anticuerpo o fragmento de anticuerpo, una región variable de dicho anticuerpo o una región hipervariable de dicho anticuerpo de acuerdo con la invención.

La presente invención permite la genoterapia de administrar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención a un huésped mamífero. Este procedimiento comprende administrar un ácido nucleico que codifica el anticuerpo o fragmento de anticuerpo deseado a un mamífero en una cantidad y durante un tiempo eficaz para inhibir la angiogénesis en un sitio predeterminado o para inhibir la neovascularización tumoral.

## Breve descripción de las figuras

Fig. 1: dimerización de cadherina VE. Se proponen dos formas de dímeros de cadherina VE basándose en las estructuras cristalinas resueltas para las cadherinas N y E. El “dímero catenario” (figuras de la izquierda) se refiere a las interacciones homófilas entre dos moléculas de cadherina VE sobre la superficie de la misma célula. El “dímero de adhesión” (figuras de la derecha) se refiere a las interacciones homófilas entre las moléculas cadherina VE localizadas en células opuestas.

Fig. 2: alineación de las secuencias del dominio extracelular 1 (ECD1) de cuatro cadherinas clásicas. Se predice que cuatro regiones del dominio 1 para cadherina VE engloban la superficie de unión o bien del dímero catenario o del dímero de adhesión. Se sintetizan cuatro péptidos (figuras inferiores) que engloban estas regiones generando inhibidores específicos de anticuerpos. Péptidos:

1: DEIWNQMHIDECKNE-Cys; 2: YYKDQSNXNRQNAKY-Cys; 3: KYVLQGEFAGKIFGVDA-Cys y 4: LIVDKNTNKNLEQP-Cys. Estos péptidos se representan en la SEC. ID. N.º: 1 y 4-6, respectivamente. El resto de cisteína se añadió en el extremo carboxilo de cada péptido para el acoplamiento KLH.

Fig. 3: Efectos de los anticuerpos contra péptidos ECD1 sobre la permeabilidad paracelular de las células H5V.

Fig. 4: El anticuerpo E4B9 no muestra un efecto significativo sobre la permeabilidad paracelular. Los anticuerpos E4B9 y 6D 10 no ejercen un efecto drástico sobre permeabilidad vascular.

Fig. 5A y 5B: El anticuerpo E4B9 muestra una potente actividad contra la angiogénesis en el ensayo de microbolsas corneales en ratón. Se analizan tres ojos representativos de cada grupo experimental (6 ratones/grupo). El anticuerpo E4B9 posee >80% de actividad inhibitoria sobre la neovascularización corneal.

Fig. 6: El anticuerpo E4B9 reacciona con cadherina VE humana.

Fig. 7: Mapeo de epítomos de anticuerpos monoclonales nuevos. Estrategia de mapeo del epítomo de los mAb 19E6 y 6D10.

Fig. 8: Resumen de la información de los epítomo para los anticuerpos contra el péptido ECD1. El epítomo del anticuerpo 10G4 se mapeó en el dominio 1 de cadherina VE de ratón usando la misma estrategia que se describe anteriormente en la Fig. 7.

Fig. 9: Región de epítomos previstos para los anticuerpos 19E6 y 10G4. Las regiones subrayadas son los epítomos de los anticuerpos E4B9 y Cad-5, respectivamente.

### Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona anticuerpos antagonistas de cadherina VE que inhiben las interacciones entre cadherina VE y cadherina VE sin alterar sustancialmente las uniones adherentes ya formadas. Con esto, el antagonista inhibe o previene sustancialmente la formación de nuevas uniones adherentes intercelulares sin alterar sustancialmente las uniones adherentes existentes. Así, estos anticuerpos, y sus fragmentos que mantienen la especificidad antigénica del anticuerpo intacto, son capaces de unirse específicamente a un sitio de una cadherina VE de mamífero en los 15-20 aminoácidos del extremo N del dominio 1 de la cadherina VE de mamífero, son capaces de inhibir la formación de uniones adherentes mediada por cadherina VE *in vitro* pero no tienen capacidad de ejercer ningún efecto significativo o sustancial sobre la permeabilidad paracelular *in vitro*. El sitio de unión está entre los primeros 15 aminoácidos del extremo N de la cadherina VE.

Del mismo modo, la unión específica puede ser a un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. N.º: 2 (DWIWNOMHIDEKNE). En todos los casos, los anticuerpos antagonistas mantienen la capacidad de inhibir la formación de nuevas uniones sin alterar las uniones existentes.

Por lo tanto, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de esta invención no ejercen ningún efecto significativo o sustancial sobre la permeabilidad vascular *in vivo*. De forma similar, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de la invención son sustancialmente no tóxicos cuando se administran a un animal o mamífero. Del mismo modo, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de la invención pueden inhibir la angiogénesis *in vivo* o *in vitro* o inhibir la metástasis tumoral. El anticuerpo preferido de la invención es el anticuerpo monoclonal murino E4B9.

Los mamíferos de la invención incluyen, pero sin limitación, animales domesticados (tales como ganado vacuno, porcino, perros y gatos), ratones, primates y seres humanos. Los seres humanos son el mamífero preferido.

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de la invención pueden usarse en procedimientos de inhibir la angiogénesis, en procedimientos de inhibir la metástasis tumoral, en procedimientos de tratar un trastorno de proliferación celular asociado a la vascularización, y en procedimientos para reducir o inhibir la vasculatura tumoral.

La presente invención también incluye anticuerpos quiméricos, monocatenarios y humanizados, así como diacuerpos, triacuerpos, fragmentos Fab, o el producto de una colección de expresión de Fab.

Los anticuerpos de la invención pueden prepararse mediante procedimientos convencionales que son notorios en la técnica. Preferiblemente, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales, pero la invención también contempla el uso de anticuerpos policlonales mono-específicos. Los anticuerpos policlonales mono-específicos pueden prepararse extrayendo por adsorción las especificidades no deseadas de una preparación de anticuerpos policlonales preparados con un inmunógeno de cadherina VE adecuado. Los inmunógenos adecuados para la preparación de los anticuerpos incluyen pero sin limitación una cadherina VE de mamífero, fragmentos de una cadherina VE de mamífero, preferiblemente los dominios extracelulares de cadherina VE, péptidos del dominio 1 del extremo N de una cadherina VE de mamífero, y proteínas de fusión con cualquiera de estas moléculas. Cuando sea apropiado, las moléculas (por ejemplo, péptidos) pueden unirse a las moléculas de vehículo tales como BSA, KLH o cualquier otro vehículo conocido en la técnica. El inmunógeno preferido es un péptido constituido esencialmente por los 15 restos aminoácidos del extremo N de una cadherina VE de mamífero.

Las técnicas que se usan para la preparación de anticuerpos monoclonales, incluyen, pero sin limitación, la técnica del hibridoma (Kohler & Milstein, Nature, 256:495-497 (1975)), técnicas de presentación en fagos, la técnica de triomas, la técnica de hibridomas de linfocitos B humanos (Kozbor y cols., Immunology Today 4:72, (1983)), y la técnica de EBV-hibridomas para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole, y cols., 1985, En Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., páginas 77-96).

Otro aspecto de la invención incluye los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales de la invención. Uno de dichos hibridomas produce el anticuerpo de rata contra cadherina VE murina E4B9 que está depositado en la ATCC, número de acceso PTA-1618, tal como se indica anteriormente.

Las técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (documento U.S. 4.946.778) se adaptan para producir anticuerpos monocatenarios contra productos polipeptídicos inmunógenos de esta invención.

Por ejemplo pueden crearse anticuerpos de la invención contra péptidos de cadherina VE, así como contra fragmentos, análogos y derivados de un péptido de cadherina VE. Los términos proteína, péptido, y polipéptido, se usan de forma intercambiable en el presente documento. Los términos “fragmento”, “derivado” y “análogo” se refieren a un polipéptido que o bien mantiene sustancialmente la misma función o actividad biológicas que el polipéptido de cadherina VE, o mantiene la capacidad de unirse al ligando incluso aunque el polipéptido no actúe como receptor de quimiocinas, por ejemplo, una forma soluble del polipéptido de la membrana. El polipéptido de la presente invención comprende, por ejemplo, un polipéptido recombinante, un polipéptido natural o un polipéptido sintético.

Un análogo incluye, por ejemplo, una proproteína que se activa por escisión de la porción de proproteína para producir un polipéptido maduro activo. Los fragmentos del polipéptido de cadherina VE incluyen péptidos de cadherina VE que tienen un fragmento del extremo N que comprende la secuencia de aminoácidos de la Fig. 2, o un fragmento de la misma. Los derivados o análogos del polipéptido de la Fig. 2 incluyen una o más secuencias de las SEC. ID. N.º 1-3, y comprenden, por ejemplo, (i) péptidos en los que uno o más de los restos aminoacídicos están sustituidos por un resto aminoacídico conservado o no conservado, (ii) péptidos en los que uno o más de los restos aminoacídicos incluyen un grupo sustituyente, (iii) péptidos en los que el polipéptido maduro está fusionado con otro compuesto, tal como un compuesto para aumentar la semivida del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol), (iv) péptidos en los que los aminoácidos adicionales están fusionados al polipéptido maduro mediante purificación del polipéptido; (v) péptidos en los que un fragmento del polipéptido es soluble, es decir no está unido a la membrana, pero que aún así se une a ligandos del péptido o receptor unido a la membrana, o (vi) una combinación de (i) a (v). Se estima que dichos fragmentos, derivados y análogos están dentro del alcance de los expertos en la técnica a partir de las enseñanzas del presente documento.

Los polipéptidos y polinucleótidos de la presente invención preferiblemente se proporcionan en una forma aislada, y preferiblemente se purifican a homogeneidad. Sin embargo, no es siempre necesario. Además, los polipéptidos de la invención tienen al menos 70% de similitud (preferiblemente un 70% de identidad) con uno o más péptidos de las SEC. ID. N.º: 1-3 y más preferiblemente un 90% de similitud (más preferiblemente un 90% de identidad) con uno o más péptidos de las SEC. ID. N.º: 1-3 y todavía más preferiblemente un 95% de similitud con los péptidos de las SEC. ID. N.º 1-3 y una porción de dicho péptido.

Tal como es sabido en la técnica, la “similitud” entre dos polipéptidos se determina comparando la secuencia de aminoácidos y los sustituyentes aminoacídicos conservados en la misma del polipéptido con la secuencia de un segundo polipéptido.

De acuerdo con otra realización de la invención, los anticuerpos de la invención pueden prepararse mediante técnicas de ingeniería genética clonando y expresando todo o parte de un anticuerpo conocido. Usando dichas técnicas, que son conocidas en la técnica, puede prepararse una versión humanizada de anticuerpos no humanos. Por ejemplo, puede prepararse una versión humanizada de E4B9 monoclonal por clonación del gen que codifica este anticuerpo en un vector de expresión adecuado. Los ácidos nucleicos de utilidad en este aspecto son los que codifican una secuencia de aminoácidos en la que la secuencia de aminoácidos comprende la región variable, la región hipervariable, o ambas de un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al dominio 1 de un dominio extracelular de un péptido de cadherina VE para inhibir la formación de nuevas uniones sin alterar la vasculatura normal.

Más particularmente, la presente invención también incluye construcciones recombinantes que comprenden una o más de las secuencias que se describen en términos generales anteriormente. Las construcciones comprenden un vector, tal como un plásmido o vector vírico, en el que se ha insertado una secuencia de la invención, en orientación codificante o no codificante. En una realización preferida de esta realización, la construcción comprende además secuencias reguladoras, que incluyen, por ejemplo, un promotor, ligado operablemente a la secuencia. Los expertos en la técnica conocen grandes números de vectores y promotores adecuados, y están disponibles comercialmente. A modo de ejemplo, se proporcionan los siguientes vectores. Bacterianos: pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen), pbs, pD10, phagescript, psiX174, pbluescript SK, pbsks, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A (Stratagene); ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia). Eucariotas: pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG, pSVL (Pharmacia). Sin embargo, puede usarse cualquier otro plásmido o vector en tanto en cuanto sean replicables y viables en el huésped.

Las construcciones en células hospedadoras se usan de forma convencional para producir el producto génico que codifica la secuencia recombinante. Los vectores de clonación y expresión apropiados para usar con huéspedes procaríotas y eucariotas se describen en Sambrook, y cols., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor, N. Y., (1989).

Usando la invención, pueden proporcionarse mamíferos transgénicos que expresen anticuerpos humanizados contra productos polipeptídicos inmunógenos de esta invención. Así, pueden proporcionarse huéspedes mamíferos transgénicos novedosos, que no sean primates, en particular que no sean seres humanos, en los que el huésped sea capaz de desarrollar una respuesta inmunitaria contra un inmunógeno, donde la respuesta produzca anticuerpos que tengan regiones constantes y/o variables de primate, en particular humanas u otras secuencias peptídicas efectoras de interés.

Los huéspedes se caracterizan por ser capaces de producir anticuerpos xenógenos o modificados como resultado de la sustitución y/o inactivación de los locus que codifican la subunidad inmunoglobulínica endógena. Las modificaciones mantienen al menos una porción de la región constante que proporciona el ensamblaje del sitio de unión de

la región variable unida en el extremo C a un péptido funcional. El péptido funcional adopta muchas formas o conformaciones y actúa, por ejemplo, como enzima, factor de crecimiento, proteína de unión, ligando, citocina, proteína efectora, proteína quelante, etc. Los anticuerpos son de cualquier isotipo, es decir, IgA, IgD, IgE, IgG, IgM o subtipos dentro del isotipo.

5

Los huéspedes transgénicos incluyen murinos, lagomorfos, ovinos, porcinos, equinos, caninos y felinos. Principalmente se han usado ratones para la producción de linfocitos B. Debería entenderse que fácilmente pueden sustituirse los ratones por otros animales, siguiendo los mismos procedimientos.

10

Los anticuerpos humanizados y quiméricos se preparan de acuerdo con las siguientes estrategias. En una estrategia, se introducen los complejos de genes de la inmunoglobulina de cadena pesada y ligera humana en la línea germinal del ratón y en una etapa aparte se inactivan los genes de ratón correspondientes. Los polinucleótidos que codifican la cadena pesada y ligera humana se reconstruyen en un microorganismo eucariota o procariota apropiado y los fragmentos de polinucleótido resultantes se introducen después en los pronúcleos de oocitos de ratón fertilizados o en células madre embrionarias. La inactivación de los locus de las inmunoglobulinas endógenas de ratón se logra mediante alteración dirigida de los locus apropiados mediante recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón. En cada caso, se generan animales quiméricos que se derivan en parte de células madre embrionarias modificadas y son capaces de transmitir las modificaciones genéticas a través de la línea germinal. El apareamiento de un ratón que tienen locus de inmunoglobulina humana con un ratón que tiene locus de inmunoglobulina inactivada da animales que producen anticuerpo totalmente humano.

20

En otra estrategia, los fragmentos de los locus de la inmunoglobulina de cadena pesada y ligera humana se usan directamente para sustituir los locus de ratón correspondientes mediante recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón. Después se generan animales transgénicos quiméricos. Los anticuerpos humanos resultantes se aíslan, por ejemplo, de otras proteínas usando una columna de afinidad que tenga un resto que se une a Fc, tal como proteína A.

25

La organización, localización relativa de los exones que codifican los dominios individuales, y la localización de los sitios de ajuste y los elementos transcripcionales en un número de animales son conocidos por las personas de experiencia ordinaria en la técnica. En los seres humanos, por ejemplo, el locus de la cadena pesada de la inmunoglobulina está situado en el cromosoma 14. En la dirección 5'-3' de la transcripción, el locus comprende un gran complejo de genes de región variable ( $V_H$ ), los genes de la región de diversidad (D), seguido de los genes de la región de unión ( $J_H$ ) y el complejo de genes de región constante ( $C_H$ ). Se ha estimado que el tamaño del locus es de aproximadamente 2.500 kilobases (kb). Durante el desarrollo de los linfocitos B, se juxtaponen segmentos genéticos discontinuos del locus de la Ig H de la línea germinal mediante reordenación física del ADN.

35

La producción de un polipéptido de inmunoglobulina de cadena pesada funcional requiere la unión de tres segmentos discontinuos de ADN, de las regiones  $V_H$ , D, y  $J_H$ , en una secuencia específica que genera las unidades funcionales. Una vez se han formado estas unidades, se producen cadenas pesadas específicas tras la transcripción del locus de la inmunoglobulina. Hay dos locus para las cadenas ligeras de la inmunoglobulina (Ig L), el locus kappa del cromosoma humano 2 y el locus lambda del cromosoma humano 22. La estructura del locus Ig L es similar a la del locus de Ig H, excepto que no está presente la región D.

40

Se usa toda la región V, o diversos fragmentos de la región V para producir un amplio espectro de anticuerpos de alta afinidad. Por ejemplo, se usa un subconjunto de los genes de la región V conocidos de los locus de la Ig de cadena pesada y ligera humana (Berman y cols., EMBO J. 7: 727-738 (1988)) para producir huéspedes transgénicos, huéspedes transgénicos que son capaces de desarrollar una potente respuesta inmunitaria y proporcionar anticuerpos de alta afinidad.

45

Se usan linfocitos B que producen anticuerpos o análogos de anticuerpos del huésped transgénico, por ejemplo, para fusionarlos con una célula mieloide de análogo para producir hibridomas o se immortalizan mediante otro procedimiento convencional, es decir, transfección con oncogenes. Estas células inmortalizadas después se cultivan, por ejemplo, en cultivo continuo o se introducen en el peritoneo de un huésped compatible para la producción de ascitis.

50

Tal como se describe anteriormente, la presente invención también proporciona la producción de anticuerpos policlonales humanos contra suero o anticuerpos monoclonales humanos o análogos de anticuerpos con la condición de que mantengan las actividades de los anticuerpos de la invención. El componente que se une a epítipo de la presente invención se refiere a proteínas constituidas por uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de la superfamilia de las inmunoglobulinas (es decir, The Immunoglobuline Gene Superfamily, Williams & Barclay En: Immunoglobuline Genes, Honjo, Alt, y Rabbits, editores, (1989)). Por ejemplo, un componente de unión de epítipos comprende parte o toda la cadena pesada, parte o toda la cadena ligera, o ambas. Sin embargo, un componente de unión de epítipos debe contener una porción suficiente de un producto genético de la superfamilia de las inmunoglobulinas para mantener la capacidad de unirse a una diana o epítipo específicos.

60

En el alcance de esta invención se encuentran los anticuerpos biespecíficos que se forman uniendo dos componentes que se unen a epítipos que tienen diferentes especificidades de unión.

65

Es notorio que las formas nativas de las inmunoglobulinas “maduras” varían algo en lo que se refiere a la longitud debido a deleciones, sustituciones, inserciones o adiciones de uno o más aminoácidos en las secuencias. Así, tanto las regiones variables como constantes se ven sometidas a una modificación natural sustancial, sin embargo son “sustancialmente idénticas” y todavía son capaces de mantener sus actividades respectivas.

Los polinucleótidos que codifican las regiones constante y variable humanas se aíslan de acuerdo con procedimientos notorios a partir de una variedad de células humanas, pero preferiblemente linfocitos B inmortalizados. Se usan procedimientos similares para aislar secuencias de inmunoglobulinas no humanas de fuentes no humanas. Las células fuente adecuadas para los polinucleótidos y sus productos expresados y segregados se obtienen a partir de un número de fuentes, tales como la American Type Culture Collection (“Catalogue of Cell Lines and Hybridomas”, Quinta edición (1985) Rockville, Md., U.S.A.)

Además de estas formas naturales de cadenas de inmunoglobulinas, las cadenas pesadas y ligeras “sustancialmente” modificadas se diseñan y fabrican fácilmente usando diversas técnicas de ingeniería genética notorias para los expertos en la técnica. Por ejemplo, las cadenas varían de la secuencia natural al nivel de la estructura primaria en varias sustituciones de aminoácidos, adiciones y deleciones en los extremos e intermedias. De forma alternativa, se producen fragmentos de polipéptidos que comprenden sólo una porción de la estructura primaria, fragmentos que poseen una o más actividades de las inmunoglobulinas (es decir, actividad de unión).

En particular, se observa que al igual que muchos genes, los genes relacionados con las inmunoglobulinas contienen regiones funcionales separadas, que cada una tiene una o más actividades biológicas diferentes. En general, las modificaciones de los genes que codifican los componentes de unión de epítopos deseados se logran fácilmente mediante una variedad de técnicas notorias, tales como mutagénesis dirigida al sitio (véase, Gillman & Smith, *Gene* 8:81-97 (1979) y Roberts, y cols., *Nature* 328:731-734 (1987)).

En realizaciones preferidas de la invención, el componente de unión a epítopos del anticuerpo de esta invención es codificado por genes de inmunoglobulinas que son “quiméricos” o “humanizados” (véase, de forma general, Queen (1991) *Nature* 351:501). Una vez expresados, los anticuerpos contra cadherina VE, los componentes de unión a epítopos, sus dímeros, o las cadenas ligera y pesada individuales se purifican de acuerdo con procedimientos estándar de la técnica, por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio, cromatografía en columna fraccionada o electroforesis en gel (véase, de forma general, Scopes, *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y. (1982)). Una vez purificados, parcialmente o a homogeneidad, según se desee, los anticuerpos y sus fragmentos se usan después, por ejemplo, de forma terapéutica, diagnóstica, en técnicas de tamización de fármacos o para desarrollar y realizar procedimientos de ensayos, tales como tinciones por inmunofluorescencia.

Una vez se analiza un anticuerpo monoclonal contra cadherina VE candidato y se confirma que no aumenta la permeabilidad vascular *in vivo*, puede determinarse la actividad y/o eficacia contra cadherina VE de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo mediante un número de procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Dichos ensayos incluyen, pero sin limitación, ensayos de angiogénesis *in vivo*. Tres ensayos de angiogénesis *in vivo*, el ensayo de microbolsillo corneal, el de capa de Matrigel y el de células tumorales encapsuladas en Alginate son de utilidad particular para evaluar la actividad antiangiogénica de los anticuerpos monoclonales contra cadherina VE. Habitualmente, los anticuerpos (o fragmentos de anticuerpo) primero se analizan en el ensayo de microbolsillo corneal, dado que este ensayo requiere menos anticuerpo para el análisis y lleva menos tiempo que los otros ensayos. Diversas cantidades de anticuerpos o bien se incorporan en gránulos implantados quirúrgicamente o se administran de forma sistémica. Los anticuerpos con actividad inhibidora significativa sobre la neovascularización corneal se analizan además en los ensayos con capa de Matrigel y Alginate. Los ensayos con capa de Matrigel y Alginate sirven para confirmar las actividades antiangiogénicas de los anticuerpos contra cadherina VE y permiten cuantificar la actividad antiangiogénica entre diversos anticuerpos y controles. Los anticuerpos contra cadherina VE que muestran inhibición de la angiogénesis *in vivo* se analizan además para determinar su actividad antitumoral en modelos de tumor. Para estos estudios se usa el modelo de xenoinjerto de carcinoma epidermoide humano A431, el modelo tumoral subcutáneo de pulmón de Lewis y el modelo de metástasis de pulmón de Lewis.

El ejemplo 5 proporciona ensayos adicionales así como ejemplos detallados que aplican dichos ensayos y técnicas para evaluar adicionalmente los anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpo de la invención.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos antagonistas de la presente invención son de utilidad para la administración a sujetos que las necesiten. La administración se logra por vías de administración diferentes, que incluyen oral, o parenteral (subcutánea, intramuscular o intravenosa.) Las composiciones para administración parenteral habitualmente comprenden una solución del anticuerpo o un cóctel de los mismos disueltos en un vehículo aceptable, preferiblemente un vehículo acuoso. Se usa una variedad de vehículos acuosos, es decir, agua, agua tamponada, solución salina al 0,4% o glicina al 0,3%. Estas soluciones son estériles y generalmente están libres de materia en partículas. Estas composiciones se esterilizan, por ejemplo, mediante técnicas de esterilización convencionales.

El vehículo o diluyente de la composición de la invención comprende, por ejemplo, sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según sean necesarias para aproximarse a las condiciones fisiológicas tales como agentes de ajuste del pH y tamponadores, agentes de ajuste de la toxicidad y similares, por ejemplo acetato sódico, cloruro sódico, cloruro potásico, cloruro cálcico, lactato sódico, etc. La concentración del agente en estas formulaciones varía



mucho, es decir, de menos de aproximadamente 0,01%, preferiblemente al menos aproximadamente 0,1% hasta como mucho aproximadamente 5% en peso. El intervalo de concentración se selecciona principalmente basándose en los volúmenes de líquido, viscosidades o modo de administración particular seleccionado.

5 Así, una composición farmacéutica típica para inyección intramuscular se formula para que contenga, por ejemplo, aproximadamente 1 ml de agua tamponada estéril, y aproximadamente 1 mg del agente. Una composición típica para la infusión intravenosa se formula para que contenga, por ejemplo, aproximadamente 250 ml de solución de Ringer estéril, y 10 mg del agente. Los procedimientos exactos para preparar composiciones administrables por vía parenteral son conocidos o serán obvios para los expertos en la técnica y se describen con más detalle, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Science, 15ª ed., Mack Publishing Company (1980).

Los anticuerpos de esta invención, por ejemplo, se liofilizan para su almacenamiento y se reconstituyen en un vehículo adecuado antes de usar. Se ha demostrado que esta técnica es eficaz con inmunoglobulinas convencionales y técnicas de liofilización y reconstitución conocidas en la técnica. Las composiciones que contienen los presentes anticuerpos o un cóctel de los mismos se administran para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos.

Un procedimiento de inhibir la angiogénesis comprende administrar una composición que contiene un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención a un mamífero durante un tiempo y en una cantidad eficaz para inhibir la angiogénesis. De forma similar, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo pueden usarse en procedimientos de inhibir la metástasis tumoral en un mamífero administrando una composición que contiene un anticuerpo de la invención a un mamífero durante un tiempo y en una cantidad eficaz para inhibir la metástasis de un tumor.

Un procedimiento de tratar un trastorno de proliferación celular asociado a vascularización en un mamífero que comprende administrar una composición que contiene un anticuerpo o fragmento de anticuerpo a un mamífero en una cantidad eficaz para inhibir la proliferación de células endoteliales sin alterar la vasculatura normal existente.

Otro procedimiento para reducir o inhibir la vasculatura tumoral en un mamífero comprende administrar una composición que contiene un anticuerpo o fragmento de anticuerpo a un mamífero en una cantidad eficaz para inhibir la formación de vasos sanguíneos sin afectar adversamente a la vasculatura existente. Los tumores que pueden tratarse incluyen, pero sin limitación, carcinomas, gliomas, sarcomas, adenocarcinomas, adenosarcomas, adenomas así como tumores líquidos tales como tumores leucémicos y linfoides. Estos tumores pueden aparecer en todas las partes del cuerpo, por ejemplo, en el cerebro, mama, pulmón, colon, riñón, vejiga, cabeza y cuello, ovario, próstata, páncreas, piel, hueso, médula ósea, sangre, timo, útero, testículos, cuello de útero e hígado.

Tal como se usa en el presente documento "trastornos de proliferación celular" se refiere a trastornos en los que se produce una proliferación celular indeseada de uno o más subconjuntos de células en un organismo multicelular que provoca daños (es decir, incomodidad o menor esperanza de vida) al organismo multicelular. Los trastornos de proliferación se producen en diferentes tipos de animales y en seres humanos, e incluyen trastornos proliferativos de los vasos sanguíneos, trastornos fibróticos, angiogénesis, desarrollo tumoral, artritis reumatoide, y degeneración muscular senil.

Un procedimiento de genoterapia comprende administrar un ácido nucleico que codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención a un mamífero en una cantidad y durante un tiempo eficaz para inhibir la angiogénesis en un sitio predeterminado o para inhibir la neovascularización tumoral. Los procedimientos de genoterapia son conocidos en la técnica. Este procedimiento es aplicable a tratar las enfermedades asociadas a la angiogénesis tal como se menciona en el presente documento así como a inhibir los tumores que se enumeran anteriormente.

Las aplicaciones terapéuticas relacionadas con la invención comprenden el tratamiento, prevención y mejora. Si se pretende tratar, la composición se administra a un paciente que ya está afectado por la enfermedad particular, en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente la afección y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr este fin se define como una "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para este uso dependen de la gravedad de la afección y el estado general del propio sistema inmunitario del paciente, pero de forma general varían de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 mg del anticuerpo o fragmento de anticuerpo por dosis, siendo más frecuente las dosis desde aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg por paciente.

En las aplicaciones profilácticas, las composiciones que contienen el anticuerpo antagonista, o un cóctel de los mismos si es beneficioso, se administran a un paciente que todavía no padece un estado de enfermedad para potenciar la resistencia del paciente. Dicha cantidad se define como que es una "dosis profilácticamente eficaz". En este uso, la cantidad precisa depende de nuevo del estado de salud del paciente y del nivel de inmunidad general, pero de forma general varía desde aproximadamente 0,1 a 100 mg por dosis, preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg por paciente. Se realizan administraciones únicas o múltiples de las composiciones, siendo el médico que aplica el tratamiento quien selecciona los niveles de dosis y la pauta. En cualquier caso, las formulaciones farmacéuticas deberían proporcionar una cantidad del agente de esta invención suficiente para tratar de forma eficaz al paciente.

Debe entenderse que las realizaciones ejemplares que se describen en el presente documento son únicamente ilustrativas y no limitan la presente invención.

## Ejemplo 1

*Métodos*

5 Preparación de anticuerpo monoclonal: se inyectó a ratas Lewis (6-8 semanas de edad hembras) por vía subcutánea (s.c.) 0,1 ml de proteína o péptido mezclado en adyuvante completo de Freund usando una aguja de calibre 25. Se inyectó un refuerzo a las ratas cada 2-3 semanas de antígeno y se les extrajo sangre de la vena caudal todas las semanas. Después de 3 inmunizaciones de refuerzo o cuando las valoraciones en suero alcanzaban los niveles máximos, se sacrificaba a los ratones mediante inhalación de CO<sub>2</sub>. Se recuperaban los bazo de los animales sacrificados para  
 10 generación de anticuerpos monoclonales mediante técnicas convencionales.

Tamizado de anticuerpos: se tamizaron los sobrenadantes de hibridomas en un ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) para identificar los anticuerpos que se unían a cadherina VE.

15 Formación de uniones/Ensayo de cambio de Ca: el ensayo de formación de uniones se desarrolló basándose en una modificación del ensayo de interruptor de calcio (Gumbiner, B., y Simons, K., Cell Biol. 102: 457-468 (1986)). Se plaquean células CHO transfectadas o células endoteliales que expresan cadherina VE sobre portas de vidrio y se deja que formen una monocapa a confluencia. Las uniones adherentes de la monocapa se alteran artificialmente dejando el medio de cultivo sin calcio incubando con EGTA 5 mM durante 30 minutos. Después se elimina el medio que contiene  
 20 EGTA y se añade medio reciente que contiene calcio al cultivo para permitir la formación de uniones adherentes. La inhibición de la formación de uniones se mide añadiendo diversas concentraciones de anticuerpo monoclonal contra cadherina VE en el momento en el que se añade medio reciente que contiene calcio. La cinética de los procesos de alteración de las uniones y de reformación de las uniones muestra una relación directa con la desaparición y reaparición de cadherina VE en las uniones adherentes. La formación de uniones adherentes se visualiza mediante  
 25 tinción inmunofluorescente con un anticuerpo policlonal específico para cadherina VE de ratón o humana. De forma rutinaria, se incluye la inmunotinción en otra molécula de uniones adherentes (CD31) para asegurarse de que la monocapa de células tratada no revierte.

Ensayo de permeabilidad paracelular: El ensayo de permeabilidad celular se realiza sembrando células CHO transfectadas que expresan cadherina VE o células endoteliales en la cámara superior de pocillos Transwell de Costar. Los cultivos se incuban durante 2 días para permitir la formación de uniones adherentes y una monocapa de células a confluencia. Después se añaden anticuerpos de prueba a la cámara superior de las cubetas junto con FITC-dextrano. El efecto del anticuerpo contra cadherina VE sobre la permeabilidad celular (alteración de las uniones) se mide en función del FITC-dextrano que atraviesa la cámara inferior.  
 35

El ensayo de permeabilidad puede adaptarse a un formato de utilidad para la detección temprana de anticuerpos monoclonales expresados en sobrenadantes de cultivos de hibridomas. En resumen, las células de hibridoma se siembran en las cámaras inferiores de transwells (Costar, 6,0 mm de diámetro/tamaño del poro de 0,3 µm) y se cocultivan con una monocapa de células que expresan cadherina VE de ratón en el filtro superior. Las células que se usan en este  
 40 ensayo o bien son células CHO transfectadas que expresan la molécula de cadherina VE de ratón o la línea celular de endotelioma de ratón H5V. Después de cocultivar durante 3-5 días, se añade FITC-dextrano (1 mg/ml) a la cámara superior y se mide la permeabilidad mediante fluorometría en función del FITC-dextrano que cruza la monocapa celular a la cámara inferior. La actividad de permeabilidad (alteración de las uniones) del anticuerpo monoclonal candidato se calcula en términos del porcentaje de aumento de la permeabilidad de las células que expresan cadherina  
 45 VE comparada con los pocillos de control que contienen un anticuerpo monoclonal de rata de control. La actividad de permeabilidad se normaliza con respecto a los recuentos de las células de hibridoma y la producción de Ig total de rata para controlar la variación en la velocidad de multiplicación y la producción de anticuerpos entre los diferentes clones de hibridoma. La actividad de alteración de las uniones del nuevo anticuerpo monoclonal se comparan con la del anticuerpo monoclonal 19E6, que se sabe que tiene una alta actividad de alteración de uniones (aumento >150% de la permeabilidad). Sólo los anticuerpos que no muestran actividad de alteración (aprox. 25% de aumento de la permeabilidad) o una pequeña alteración (aprox. 25-75% de aumento de la permeabilidad) se someten a estudios de  
 50 tamizado adicionales para determinar su actividad de inhibición de la unión en el ensayo de formación de uniones.

Ensayo de bolsillo corneal: se anestesió a ratones C57/BL (hembras de 6-8 semanas de edad) con ketamina y se creó un bolsillo corneal en ambos ojos usando una cuchilla de cataratas von Graefe. Después se implantaron gránulos de Hydron que contenían FGF básico con o sin anticuerpo de prueba a diversas dosis en cada bolsillo ocular. De forma alternativa, se implantaron gránulos de hydron que contenía FGF básico y los ratones se trataron mediante inyección i.p. con una aguja de calibre 25 de anticuerpo de prueba a dosis diversas o controles cada 3 días. Después de 6-7 días, se examinó la respuesta angiogénica mediante biomicroscopía de lámpara de hendidura y se fotografió. Se sacrificó a  
 60 los ratones mediante inhalación de CO<sub>2</sub> y se extirparon los ojos y se prepararon para análisis histológico posterior.

## Ejemplo 2

65 *Anticuerpos monoclonales contra cadherina VE que inhiben la formación de uniones adherentes sin alterar las uniones existentes*

Se inmunizó a dos grupos de ratas Lewis o bien con una mezcla de cuatro péptidos acoplados a KLH que tenían secuencias de dominio 1 del extremo N de cadherina VE murina (Fig. 2) o con cadherina VE de ratón soluble puri-

ficada por afinidad (smVECIg) que había sido expresada en células CHO. Este inmunógeno engloba toda la región extracelular de la cadherina VE de ratón fusionada a una cadena de Fc humana. Los clones de hibridoma resultantes se analizaron para determinar la producción de anticuerpos con actividad de unión a cadherina VE usando un formato de ELISA convencional. Este tamizado identificó veinte (20) anticuerpos contra cadherina VE murina, 10 de cada uno de los grupos de ratas inmunizadas originariamente.

Se examinaron diversas propiedades de estos anticuerpos monoclonales y los resultados se resumen en las Tablas 1 y 2.

Los 20 anticuerpos contra cadherina VE candidatos se analizaron en los ensayos de “cambio del calcio” y de “permeabilidad” para examinar la actividad de inhibición de la nueva formación de uniones y la actividad de alteración de uniones existentes, respectivamente. Entre estos 20 anticuerpos, se demostró que E4B9 inhibía específicamente la formación de uniones adherentes sin afectar de forma adversa a la vasculatura normal (Fig. 3 y 4). Además, también se analizó el anticuerpo E4B9 en un ensayo de angiogénesis *in vivo* y demostró una inhibición superior al 80% de la neovascularización corneal (Fig. 5). Aunque también se identificó otro anticuerpo (19E6) como inhibidor potente de la formación de uniones adherentes mediada por cadherina VE mediante el criterio del ensayo *in vitro*, este anticuerpo altera las uniones existentes (Fig.3). Las actividades biológicas clave de estos dos anticuerpos se resumen en la Tabla 3 junto con datos de otros anticuerpos contra cadherina VE murinos y humanos.

TABLA 1

Anticuerpos contra cadherina VE preparados contra inmunógenos peptídicos				
MAb <sup>1</sup>	mECD1~2 bacteriano (Transf.)	VEC Nativa (Transf.)	Ensayo de cambio de Ca <sup>2+</sup> (IF)	Permeabilidad paracelular (% de aumento)
19E6 <sup>2</sup>	+	+	+	120 ~150
6D10	+	+	+	20
E4B9 (P1) <sup>3</sup>	+	+	+	<20
E4G10 (P1)	+	+	+	<20
E3F2 (P2)	+	-	-	<20
1F6.1 (P2)	+	-	-	<20
10E4.1 (P2)	+	+	-	<20
8D6.1 (P4)	+	+	-	<20
9C6.1 (p4)	+	-	-	<20
3F7.1 (p4)	+	+	-	<20
4F1.1 Sup (mED1~2)	+	+	-	<20
<sup>1</sup> Abreviaturas: MAb, anticuerpo monoclonal; mECD1~2 bacteriano, proteína expresada en bacterias que contiene los dominios extracelulares 1 y 2 del extremo N de cadherina VE murina; IF, inmunofluorescencia. <sup>2</sup> Anticuerpo de control. <sup>3</sup> Este anticuerpo, E4B9, presenta reacción cruzada con cadherina VE humana.				

# ES 2 323 938 T3

TABLA 2

Anticuerpos contra cadherina VE preparados contra smVECIg					
MAb <sup>1</sup>	ELISA	?? (Transf)	Ensayo de cambio de Ca <sup>2+</sup> (IF)	Permeabilidad paracelular	Dominio
10G4	+++	+	+	+	1
9D9	+	-	-	-	1
2G7	+	-	-	-	1
13E6	+++	+	-	-	2
8A7	+++	+	-	-	2
5H6	++	+	-	-	2
3C3	+	-	-	-	2
15F12	+++	+	-	-	2
1A3	+	-	-	-	2-3
2B11	+++	+	-	-	5
<sup>1</sup> Véase la Tabla 1.					

TABLA 3

Contra VEC humana

MAb <sup>1</sup>	Epítipo	Alteración de las uniones (permeabilidad comparada con inhibición de las uniones en cambio de Ca <sup>2+</sup> )		
Cad5	Dominio 1	+++	+++	
BV9	Dominio 3	+++	+++	
BV6	Dominio 3	+++	+++	
TEA	Dominio 4	+ / -	+ / -	
Hec1.2	Dominio 4	-	-	
Contra VEC murina				
				Toxicidad
19E6	Dominio 1	+++	+++	+
E4B9	Dominio 1	+ /	+++	-
10G4	Dominio 1	ND	+++	ND
6D10	Dominio 3-4	+ /	+ /	-
<sup>1</sup> Véase la Tabla 1.				

## Ejemplo 3

*E4B9 reacciona con cadherina VE humana*

- 5 La secuencia del epítipo murino reconocida por el anticuerpo E4B9 (péptido 1) comparte una homología del 100% con cadherina VE humana, así que se examinó este anticuerpo para determinar si presenta reacción cruzada con cadherina VE humana. El análisis por transferencia Western de diversas células humanas y murinas que expresan cadherina VE indicó que E4B9 de hecho sí reacciona con cadherina VE humana (Fig. 6). Este hallazgo facilita el desarrollo de un anticuerpo E4B9 humanizado y su éxito en el desarrollo preclínico, dado que su actividad antitumoral puede analizarse extensamente en diversos modelos en ratones.

## Ejemplo 4

15 *Mapeo de epítipos*

- Para definir el dominio específico de cadherina VE que es diana de cada nuevo anticuerpo monoclonal, se generó una serie de truncados de cadherina smVE-Ig por recombinación. La estrategia de mapeo de epítipos se muestra en la Fig. 7. Los sobrenadantes de los cultivos de células COS transfectadas con estos plásmidos que portaban los truncados de cadherina smVE-Ig se usaron con ELISA para determinar los dominios de los epítipos para cada anticuerpo monoclonal. Se realizó el mapeo fino de los epítipos de los tres anticuerpos monoclonales que operan por bloqueo (E4B9, 19E6 y 10G4). Los resultados preliminares mostraron que 19E6 y 10G4 reconocen regiones diferentes de las del anticuerpo monoclonal E4B9 (Figs. 7-9).

- 25 El anticuerpo E4B9 inhibe la formación de nuevas uniones sin alterar las uniones existentes, mientras que otros anticuerpos (19E6, 10G4 y Cad-5) alteran las uniones existentes. Durante la etapa posterior de la angiogénesis, las células endoteliales separadas deben ensamblarse formando estructuras tubulares de tipo capilar que es mediada por la adhesión homófila de moléculas de cadherina VE, presumiblemente de las mismas células (dímeros de hebras) primero y después de las células opuestas (dímeros de adhesión). Por lo tanto, un anticuerpo (tal como E4B9) que actúa de antagonista de la formación de “dímeros de hebras” es suficiente para inhibir la formación de nuevas uniones. Por el contrario, la alteración de las uniones existentes es un proceso inverso, es decir, a partir de los “dímeros de adhesión” a “dímeros de hebras”. Los anticuerpos antagonistas que son específicos contra los “dímeros de adhesión” por lo tanto alteran más la vasculatura existente. El mapeo fino de epítipos y una estructura de los cristales de cadherina VE proporcionan indicios que apoyan este modelo.

## Ejemplo 5

*Evaluaciones misceláneas in vivo*

- 40 La permeabilidad vascular en tejidos se analiza mediante un ensayo de tipo Miles con algunas modificaciones (Corda, y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. 96: 9815-9820 (1999)). En resumen, el anticuerpo de prueba o fragmento se administra o bien por vía intraperitoneal o por vía intravenosa a ratones a diversas dosis (50-1000  $\mu\text{g}$ /dosis). El aumento en la permeabilidad vascular se determina inyectando tinte azul Evans (100 microlitros de 1 mg/ml) por vía intravenosa en diversos tiempos (6 h, 12 h, 24 h y 48 h.) Tras la administración, habitualmente 20 minutos después, se anestesia a los ratones con ketamina y se perfunden con aproximadamente 20 ml de PBS. Se extraen los órganos de los ratones y se homogenizan en TCA/etanol (1:1 v/v). El contenido en azul Evans de los homogenizados de tejido se cuantifican por espectrofotometría (DO = 510 nm). El efecto de los anticuerpos sobre la permeabilidad vascular se mide en términos del porcentaje de aumento en tinte azul Evans comparando con un anticuerpo de control.

- 50 Los anticuerpos monoclonales contra cadherina VE de ratón se evalúan para determinar sus efectos antitumorales en el modelo de tumor primario subcutáneo de pulmón de Lewis, el modelo de metástasis de pulmón de Lewis y el modelo de xenoinjerto subcutáneo epidermoide humano (A431). Se establecen tumores primarios subcutáneos de pulmón de Lewis en ratones C57BL/6 (6-8 semanas de edad hembras) mediante inyección s.c. de  $1 \times 10^5$  células tumorales en una suspensión de solución salina equilibrada de Hanks en el flanco derecho usando una aguja de calibre 22. Se trata a los ratones (10 ratones/grupo) con anticuerpo contra cadherina VE (50-1000  $\mu\text{g}$ ) o una IgG de rata de control no relacionada cada 3-4 días durante 3-4 semanas o hasta que los ratones están moribundos. El volumen del tumor se mide dos veces a la semana usando calibres y el volumen se calcula usando la fórmula  $\pi/6 \times \text{diámetro}^2$ . Los tumores de los ratones de cada grupo de tratamiento se extirpan quirúrgicamente para su estudio histológico y se tiñen con anticuerpo contra CD31 para evaluar la densidad vascular. En el modelo de metástasis de pulmón de Lewis, se establecen tumores primarios en las almohadillas de las patas de ratones C57BL/6. Después de 28 días, cuando los tumores alcanzan aproximadamente 100 mm<sup>3</sup>, se extirpa el tumor primario y 24 horas después se administra a los ratones (10 ratones/grupo) anticuerpo contra cadherina VE por vía i.p. (50-1000  $\mu\text{g}$ ) o una IgG de rata de control irrelevante cada 3 días. Después de 4 semanas de tratamiento, se sacrifica a los ratones y se examinan los pulmones para determinar la metástasis tumoral. También se realiza un examen histológico de los pulmones para determinar indicios de micrometástasis y se tiñen con anticuerpo contra CD31 para evaluar la densidad vascular.

## ES 2 323 938 T3

La línea celular de carcinoma epidermoide humana A431 se inyecta por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones atímicos. Una vez los tumores alcanzan 150 mm<sup>3</sup>, se divide a los ratones de forma aleatoria en los grupos de tratamiento (10 ratones/grupo) y se administra anticuerpo contra cadherina VE (50-1000 µg) o una IgG de rata de control no relacionada cada 3 días durante 4 semanas. Los tumores se miden dos veces a la semana y se extirpan cuando los ratones están moribundos o a las 4 semanas. También se realiza un examen histológico de los tumores y se tiñen con anticuerpo contra CD31 para evaluar la densidad vascular. La evaluación del tratamiento con cadherina VE se basa en la velocidad de desarrollo tumoral, en la regresión de los tumores y en la evaluación histológica de la neovascularización de tumores. La actividad del anticuerpo en cada modelo de tumor se compara con el monoclonal 19E6 que actúa de control positivo. El control negativo es un anticuerpo monoclonal de rata no relacionado. El análisis estadístico del desarrollo tumoral se determina usando una prueba T de Student bilateral en la que un valor de p de < 0,05 se considera significativo.

En el ensayo de capa de Matrigel se inyecta a ratones C57/BL (hembras de 6-8 semanas de edad) por vía s.c., 0.5 ml de factores angiogénos mezclados en Matrigel usando una aguja de calibre 25. Después se trata a los ratones por inyección i.p. con una aguja de calibre 25 con diversas dosis de anticuerpos contra cadherina VE o controles cada 3 días. Después de 10 días, se sacrifica a los ratones mediante inhalación de CO<sup>2</sup> y se recuperan las capas de los animales para el subsiguiente análisis histológico.

En el ensayo con células tumorales encapsuladas agitadas, se anestesia a ratones C57BL/6 (hembras de 6-8 semanas de edad) ketamina y después se les implantan quirúrgicamente 4 perlas por vía s.c. en el tercio superior de la espalda y se presiona para alejarlos del sitio de incisión. La incisión se cierra con grapas quirúrgicas. Después se trata a los ratones por inyección i.p. con una aguja de calibre 25 con diversas dosis de anticuerpos contra cadherina VE o controles cada 3 días. Después de 12 días, se inyecta a los ratones por vía i.v. 100 µl de una solución de 100 mg/kg de FITC-Dextrano (PM -150.000). Los animales se sacrifican mediante inhalación de CO<sup>2</sup> y las perlas se extraen, se mantienen en la oscuridad y se procesan para su cuantificación mediante FITC.

En el modelo de xenoinjerto de tumor humano, se inyecta a ratones atímicos (nu/nu) (hembras de 6-8 semanas de edad) por vía s.c. 2 x 10<sup>6</sup> células de tumor epidermoide humano A431 en una suspensión de solución salina equilibrada de Hank en el flanco derecho con una aguja de calibre 22. Una vez los tumores alcanzan 100-200 mm<sup>3</sup> de tamaño, se administra anticuerpos contra cadherina VE o un anticuerpo de control a ratones dos veces a la semana mediante inyección i.p. con una aguja de calibre 25 durante 6 semanas o hasta que los ratones se encuentran moribundos. Los volúmenes tumorales se miden dos veces a la semana con calibres. Se realiza un seguimiento de los animales que se curan de los tumores durante hasta 8 semanas después de completar el tratamiento. Los ratones que completan el estudio o que están moribundos se sacrifican mediante inhalación de CO<sub>2</sub>.

# REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de unirse específicamente a uno cualquiera del grupo que se selecciona a partir de

- una cadherina VE en un sitio que está entre los primeros 15 aminoácidos del extremo N del dominio 1 de la cadherina VE, y

- un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. N.º: 2 (DWIWNQMHIDEKNE),

en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es capaz de inhibir la formación de uniones adherentes mediada por cadherina VE *in vitro*, pero no produce ningún efecto significativo ni sustancial sobre la permeabilidad paracelular *in vitro*.

2. Anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo no ejerce ningún efecto significativo o sustancial sobre la permeabilidad vascular *in vivo*.

3. Anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo es sustancialmente no tóxico cuando se administra a un animal o a un mamífero.

4. Anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo inhibe la angiogénesis *in vivo* o *in vitro* o inhibe la metástasis tumoral.

5. Anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo inhibe la formación de nuevas uniones adherentes sin alterar las uniones adherentes existentes.

6. Anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o el fragmento de anticuerpo es de un anticuerpo monoclonal.

7. Anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** porque el anticuerpo es el anticuerpo monoclonal E4B9 murino producido por un hibridoma depositado en la ATCC, con el número de acceso PTA-1618.

8. Anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo es un anticuerpo monocatenario, es humanizado, es quimérico o es biespecífico.

9. Anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado** porque el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo está fusionado con un polipéptido heterólogo.

10. Hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal de la reivindicación 6.

11. Hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal de la reivindicación 7, depositado en la ATCC, con el número de acceso PTA-1618.

12. Composición farmacéutica, **caracterizada** porque comprende el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

13. Anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para usar como medicamentos para el tratamiento de enfermedades asociadas a angiogénesis en mamíferos.

14. Anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 13, para usar como medicamentos para el tratamiento de enfermedades neoplásicas asociadas a angiogénesis, tumores sólidos, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades vasculares colagenosas, artritis reumatoide, afecciones oftalmológicas, retinopatía diabética, fibroplasia retrolenticular o glaucoma neovascular de mamíferos.

15. Anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para usar como medicamentos en composiciones farmacéuticas para el tratamiento de mamíferos para inhibir la metástasis de tumores.

16. Anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 15 para usar como medicamentos en composiciones farmacéuticas para el tratamiento de mamíferos para inhibir metástasis de carcinomas, gliomas, sarcomas, adenocarcinomas, adenosarcomas, adenomas, tumores leucémicos y tumores linfoides.

## ES 2 323 938 T3

17. Anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para usar como medicamentos en composiciones farmacéuticas para el tratamiento de trastornos proliferativos celulares asociados a la vascularización en mamíferos para inhibir la proliferación de células endoteliales sin afectar de forma adversa a la vasculatura normal.

18. Anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la reivindicación 17 para usar como medicamentos en composiciones farmacéuticas para el tratamiento de artritis reumatoide y degeneración muscular senil.

19. Ácido nucleico aislado, que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia codificante para el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

20. Vector de expresión, que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 19 ligado operablemente a secuencias para controlar la expresión de la secuencia de nucleótidos.

21. Ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 19 para usar como medicamento para el tratamiento de enfermedades de mamíferos asociadas a angiogénesis o para inhibir la neovascularización de tumores.



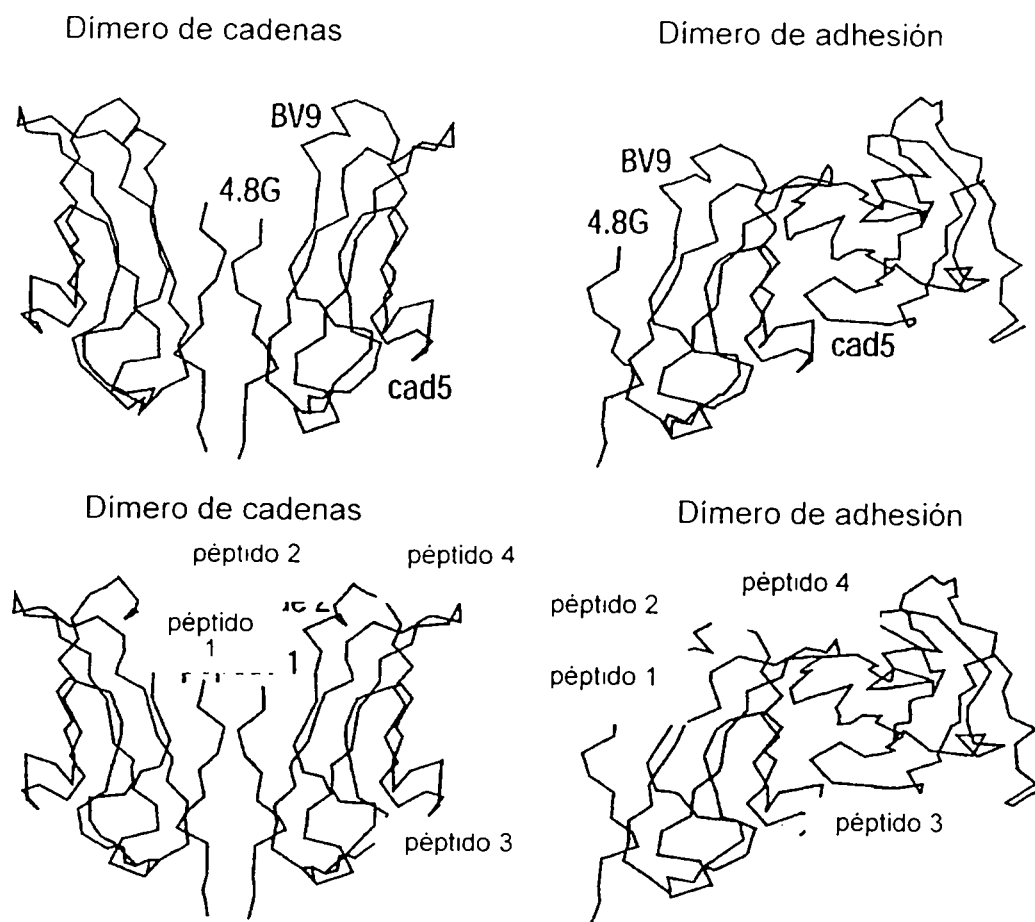


FIG. 1

DWVIPPINLPENSRGPFQELVRIRSDRDKNLSLRYSVTGPGADQPPTGIFIINP	mNC
DWVIPPISCPENEKGEFPKNLVQIKSNRDKETKVFYSITGQGADKPPVGVFIER	mEC
4.8G                      BV9                      Cad5	
DWIWNQMHIDEKNTESPHHVGGIKSSVSRK-NAKYLLKGEYVGK-----VERVDA	hVEC
<u>DWIWNQMHIDEKNE</u> SLPHYV- <u>KDQSNVNRQ-NAKYVLQGEFAGK-----IFGVDA</u>	mVEC
peptido 1	peptido 2
peptido 3	
ISGQLSVTKPLDRELIARFHLRAH <b>AV</b> DIN-GNQVENPIDIVINVIDMNDNRPEF	mNC
ETGWLKVTQPLDREAIKYL <b>YSHAV</b> SSN-GEAVEDPMEIVITVTDQNDNRPEF	mEC
<b>ETGDVFA</b> IERLDRENISEYHLTAVIVDKDTGENLETPSSFTIKVHDVNDNWPVE	hVEC
NTGNVLAVERLDREKVSEYFLTAL <b>IVDKNTNKNLEQPS</b> SFTVKVHDINDNWPVF	MVEC
peptido 4	

FIG. 2

ES 2 323 938 T3

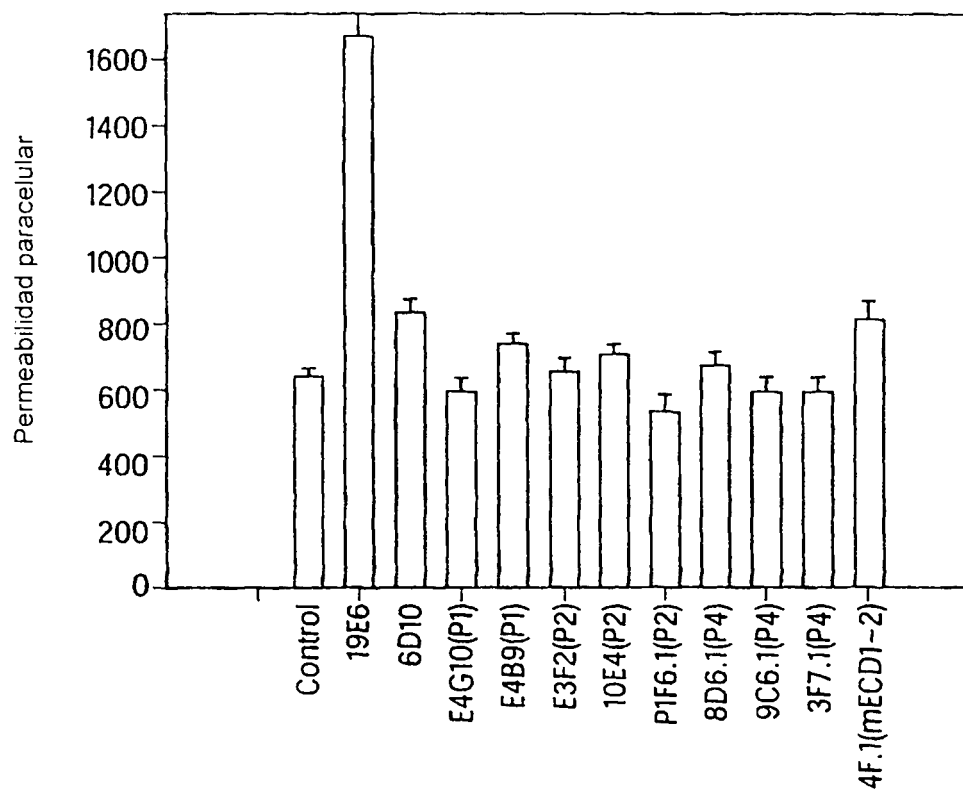


FIG. 3

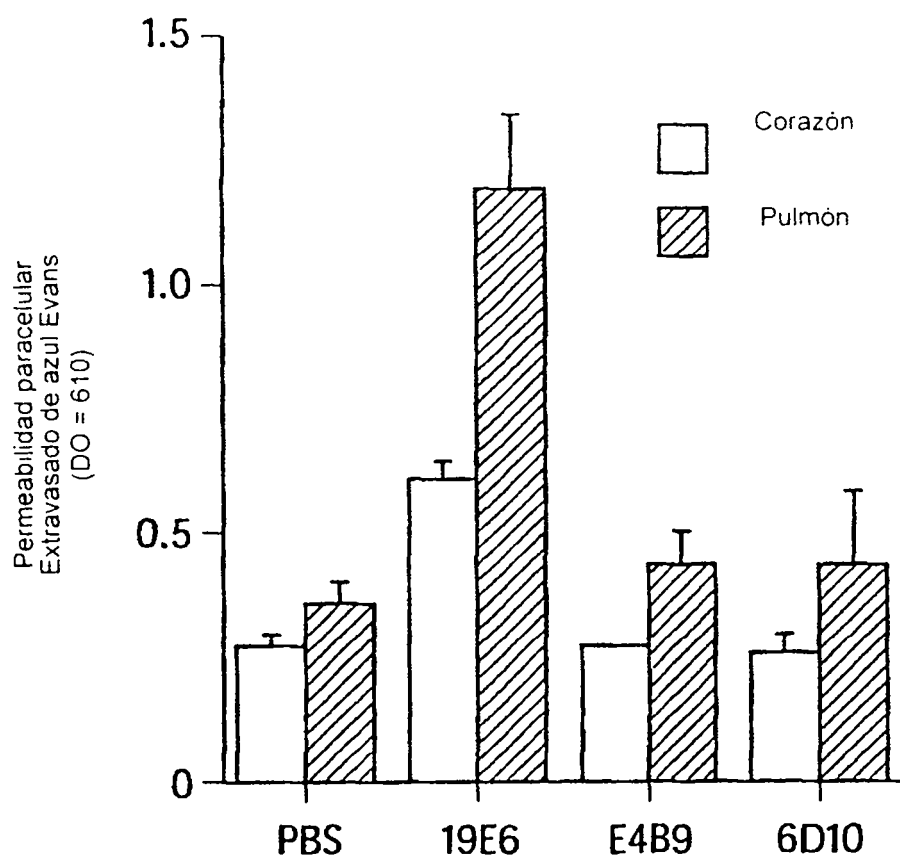


FIG. 4

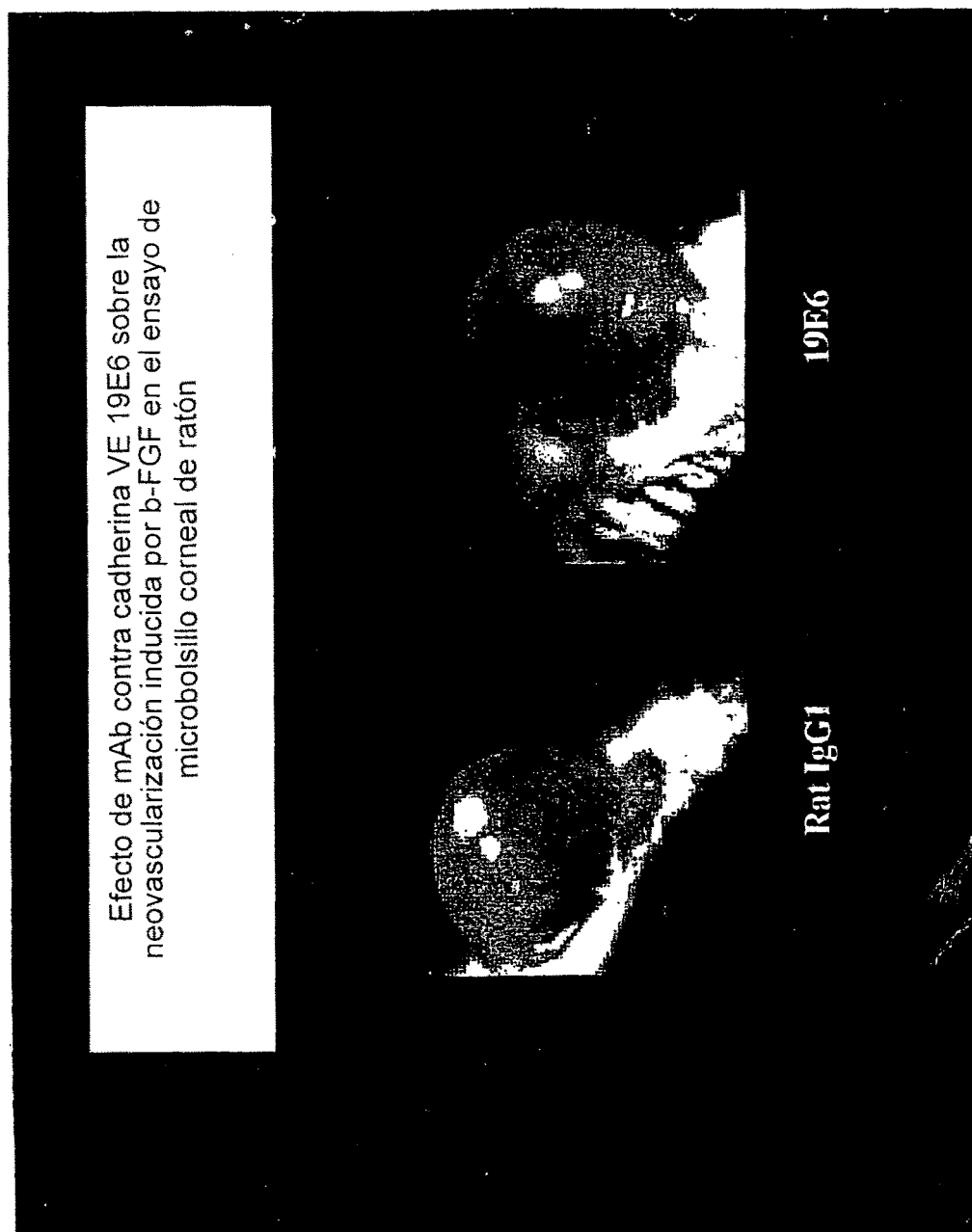


FIG. 5 A

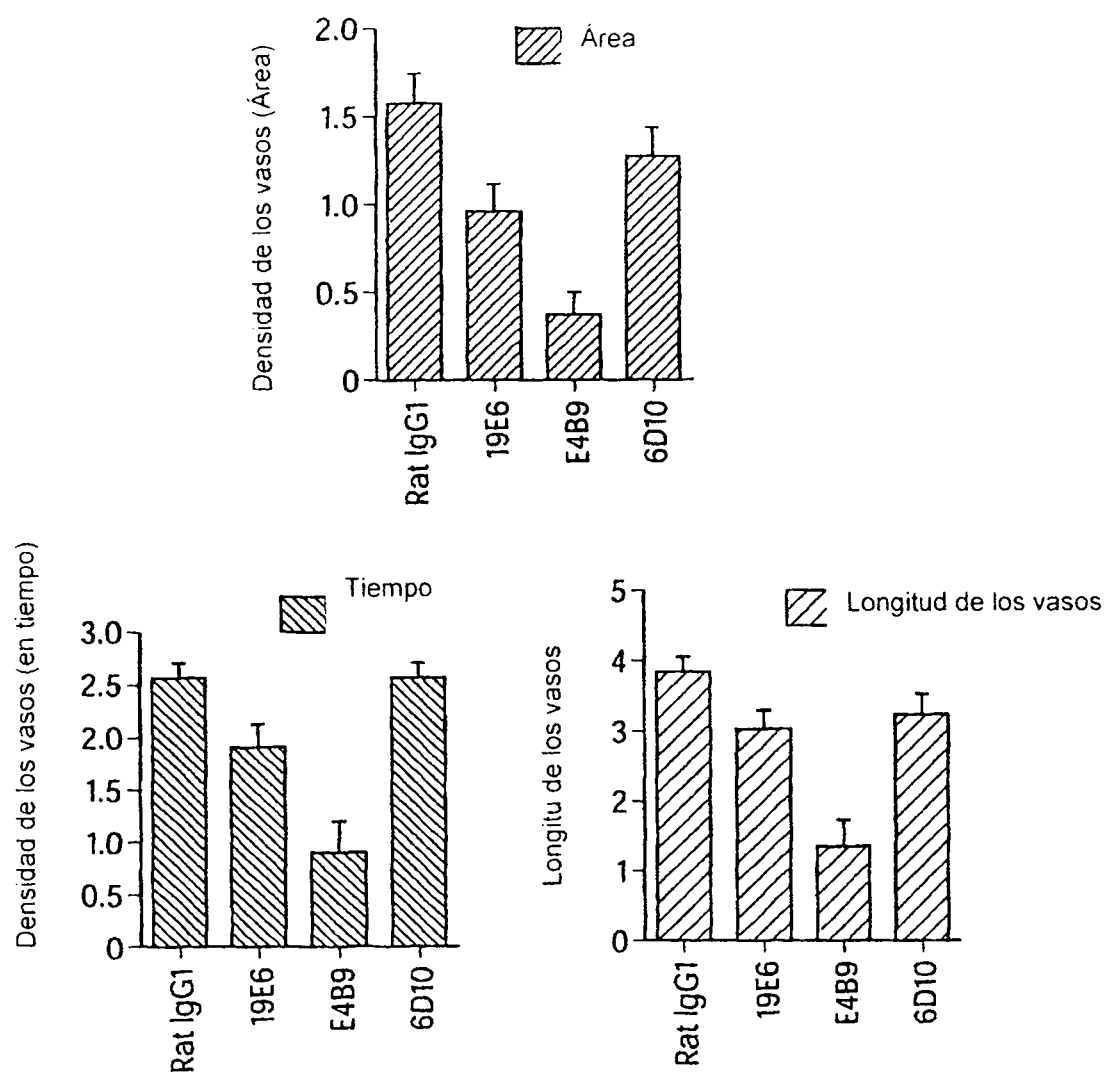


FIG. 5B

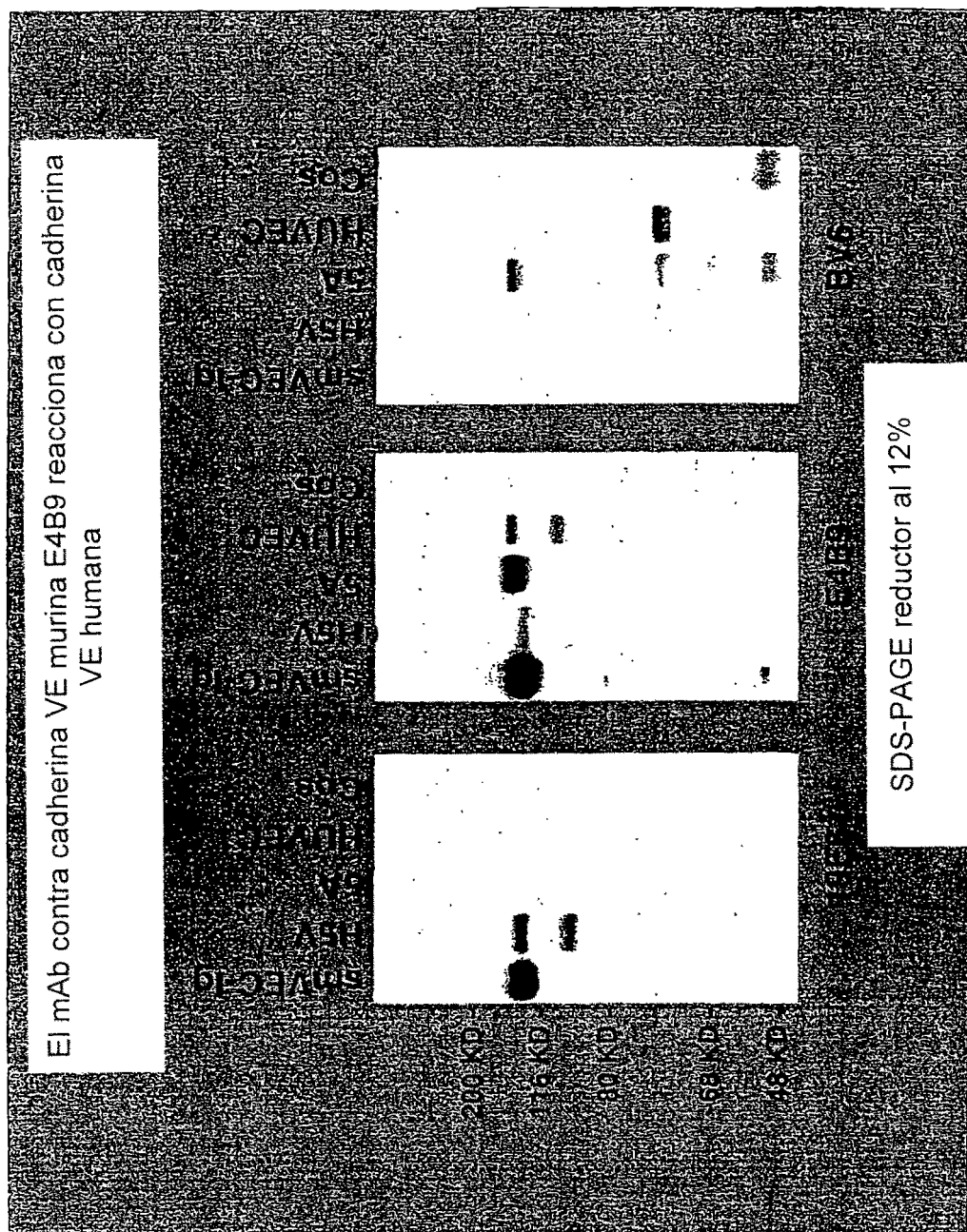


Fig.6

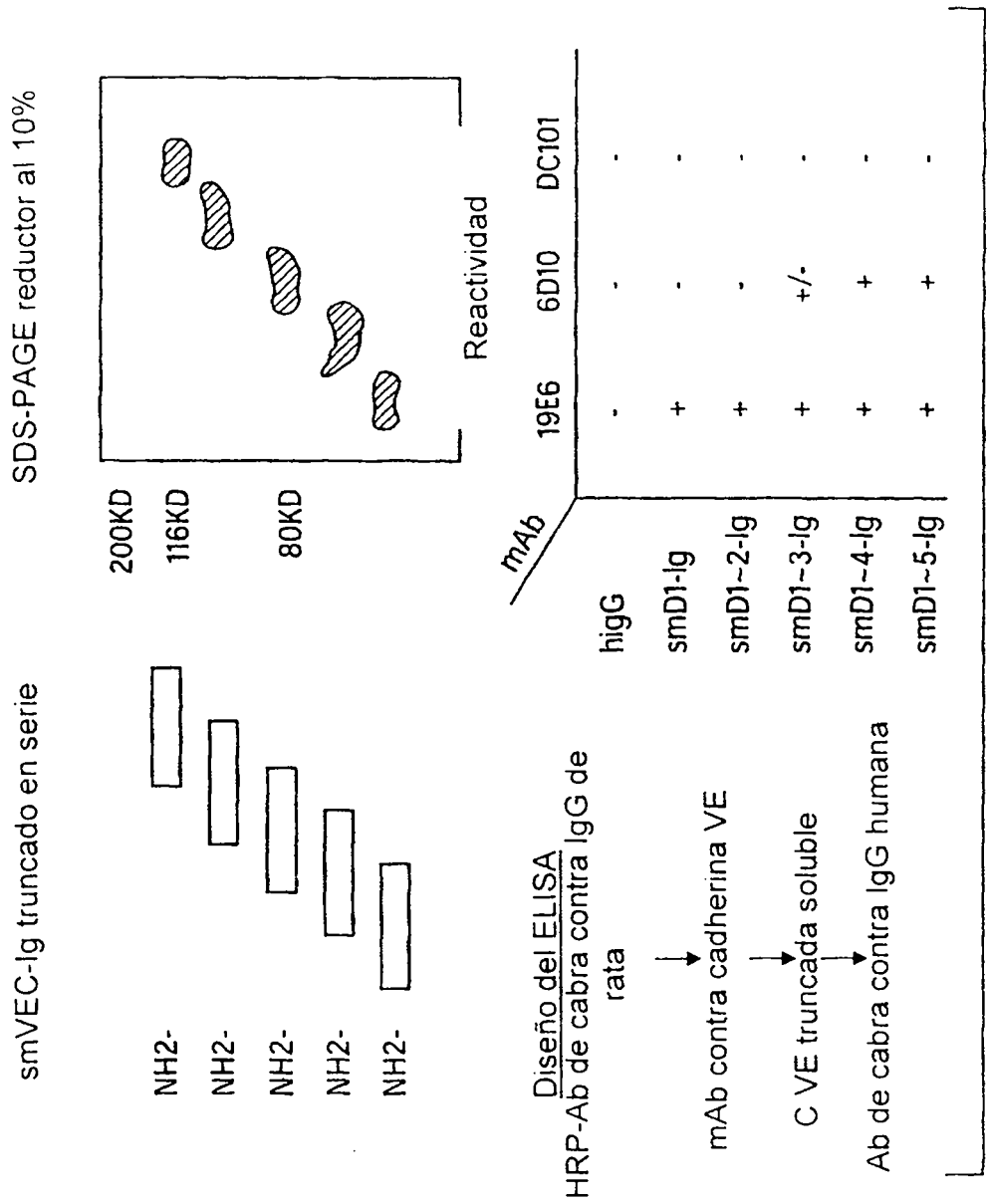


Fig.7



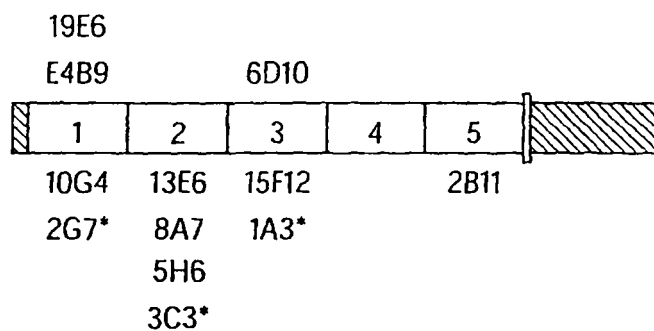


FIG. 8

DWIWNQMHI DEEKNESLPHYVKDQSNVNRQNAKYVLQGEFAGKIFGVDAN  
 E4B9 19E6, 10G4 (Cad5)

TGNVLAYERLDREKVSEYFLTALIVDKNTNKNLEQPSSFTVKVHDINDNWPVF

ECD1 murino

FIG. 9

# ES 2 323 938 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Liao, Fang  
Hicklin, Daniel J.  
5 Bohlen, Peter

<120> Anticuerpos antagonistas de cadherina VE sin efectos adversos sobre la permeabilidad vascular

<130> 11245/46976

<140> presentada el 30 de marzo de 2001

10 <141> 2000-03-31

<160> 6

<170> WordPerfect 8.0 para Windows

15 <210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Péptido sintético

<400> 1

25        Asp Glu Ile Trp Asn Gln Met His Ile Asp Glu Glu Lys Asn Glu  
         1                                5                                10                                15

<210> 2

30 <211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Péptido sintético

<400> 2

40        Asp Trp Ile Trp Asn Gln Met His Ile Asp Glu Glu Lys Asn Glu  
         1                                5                                10                                15

<210> 3

45 <211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Péptido sintético

<400> 3

55        Asp Trp Ile Trp Asn Gln Met His Ile Asp Glu Glu Lys Asn Thr  
         1                                5                                10                                15

<210> 4

<211> 16

60 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

65 <223> Péptido sintético

# ES 2 323 938 T3

<400> 4

Tyr Val Lys Asp Gln Ser Asn Tyr Asn Arg Gln Asn Ala Lys Tyr Cys  
1 5 10 15

5

<210> 5

<211> 18

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

15 <400> 5

Lys Tyr Val Leu Gln Gly Glu Phe Ala Gly Lys Ile Phe Gly Val Asp  
1 5 10 15

20

Ala Cys  
18

<210> 6

25

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Péptido sintético

<400> 6

Leu Ile Val Asp Lys Asn Thr Asn Lys Asn Leu Glu Gln Pro Cys  
1 5 10 15

35

40

45

50

55

60

65