



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 262 518**

(51) Int. Cl.:

**C12N 15/12** (2006.01)

**C07K 14/71** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**C07K 19/00** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

(96) Número de solicitud europea: **00938207 .8**

(96) Fecha de presentación : **07.06.2000**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1187918**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **20.03.2002**

(54) Título: **Antagonistas de Tek.**

(30) Prioridad: **07.06.1999 US 137889 P**

(73) Titular/es: **IMMUNEX CORPORATION**  
**One Amgen Centre Drive**  
**Thousand Oaks, California 91320-1799, US**

(45) Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **01.12.2006**

(72) Inventor/es: **Cerretti, Douglas, P.;**  
**Borges, Luis, G. y**  
**Fanslow, William, C., III**

(45) Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **08.05.2009**

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

(45) Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **08.05.2009**

**DESCRIPCIÓN**

Antagonistas de Tek.

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a antagonistas de Tek y al uso de los antagonistas de Tek para inhibir la angiogénesis u otras respuestas mediadas por Tek en un mamífero.

**10 Antecedentes de la invención****A. Angiogénesis**

Angiogénesis, la generación de nuevos vasos sanguíneos, es un proceso regulado espacial y temporalmente, en el que las células endoteliales proliferan, migran, y se ensamblan en tubos, en respuesta a moléculas endógenas de regulación positiva y negativa. La angiogénesis desempeña papeles importantes tanto en la fisiología normal como en la patológica.

En las condiciones fisiológicas normales, la angiogénesis está implicada en el desarrollo fetal y embrionario, la curación de heridas, la regeneración de órganos y los procesos de remodelación en la reproducción en la mujer, incluyendo la formación del endometrio, el cuerpo lúteo y la placenta. La angiogénesis está estrictamente regulada en condiciones normales, especialmente en animales adultos, y una perturbación de los controles reguladores puede conducir a una angiogénesis patológica.

La angiogénesis patológica ha sido implicada en la manifestación y/o progresión de enfermedades inflamatorias, ciertas afecciones oculares y cáncer. En particular, varias líneas de indicios apoyan el concepto de que la angiogénesis es esencial para el crecimiento y la persistencia de tumores sólidos y de sus metástasis (véase por ejemplo, Folkman, N. Engl. J. Med. 285:1182, 1971; Folkman y col., Nature 339:58, 1989; Kim y col., Nature 362:841, 1993; Hori y col., Cancer Res. 51:6180, 1991). Por tanto, los inhibidores de la angiogénesis se están ensayando para la prevención (por ejemplo, tratamiento de afecciones premalignas), intervención (por ejemplo, tratamiento de tumores pequeños) y regresión (por ejemplo, tratamiento de tumores grandes) de cánceres (véase por ejemplo, Bergers y col., Science 284:808, 1999).

Aunque actualmente hay varios agentes antiangiogénicos en desarrollo y ensayo como agentes terapéuticos, se necesitan procedimientos adicionales de inhibición de la angiogénesis para la prevención, eliminación y mitigación de los procesos de enfermedad que dependen de una angiogénesis patológica.

**B. Polipéptidos Tek**

Los receptores tirosinaquinasa (RTK) son una gran familia conservada evolutivamente de proteínas implicadas en la transducción de señales extracelulares al citoplasma. Entre los RTK que se cree que están implicados en la morfogénesis y el mantenimiento vasculares están los receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y Tek (véase Hanahan, Science 277:48, 1997).

Tek, que se ha denominado también Tie2 y ork, es un RTK que se expresa predominantemente en el endotelio vascular. La clonación molecular del Tek (ork) humano ha sido descrita por Ziegler, patente de EE.UU. nº 5.447.860. Se han descrito cuatro ligandos de Tek, angiopoietina-1, angiopoietina-2, angiopoietina-3 y angiopoietina-4 (Ang1, Ang2, Ang3 y Ang4) (Davis y col., Cell 87:1161, 1996; Maisonpierre y col., Science 277:55, 1997; Valenzuela y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:1904, 1999). Estos ligandos tienen distintos patrones de expresión y actividades con respecto a Tek. Los "ligandos homólogos de Tie", denominados NL1, NL5, NL8 y NL4, se describen en la patente de EE.UU. nº 6.057.435.

Los ratones con Tek desactivado presentan defectos en el desarrollo vascular y mueren durante la embriogénesis (véase Dumont, Genes Dev. 8:1897, 1994; Sato, Nature 376:70, 1995), lo que sugiere que Tek desempeña un papel en el desarrollo de la vasculatura embrionaria.

Peters y col. han descrito un inhibidor soluble de Tek (Tie2), denominado ExTek.6His, que consta de la porción extracelular íntegra del Tek murino fusionada a un marcador de seis histidinas (J. Clin. Invest. 199(8):2072, 1997; documento WO 98/18914). ExTek.6His inhibió el crecimiento y la vascularización tumoral en un modelo de cámara de ventana cutánea en rata y bloqueó la angiogénesis estimulada por medios condicionados por células tumorales en un ensayo de microbolsa corneal en rata. Peters y col. han descrito también un vector adenovírico de replicación defectuosa, denominado AdExTek, que expresa el dominio extracelular del Tek murino (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:8829, 1998; documento WO 98/18914). AdExTek inhibió el crecimiento y la metástasis de un carcinoma mamario murino y de un melanoma murino.

Aunque es posible que ExTek.6His y AdExTek demuestren ser útiles como agentes antiangiogénicos, se necesitan antagonistas de Tek adicionales y mejorados y procedimientos adicionales y mejorados para inhibir la angiogénesis u otras respuestas mediadas por Tek, usando antagonistas de Tek.

## Resumen de la invención

La presente invención proporciona antagonistas de Tek y el uso de los antagonistas de Tek para inhibir la angiogénesis u otras respuestas mediadas por Tek en un mamífero con necesidad de tal tratamiento. La invención se basa, en parte, en el descubrimiento inesperado de que los fragmentos del dominio extracelular de Tek que carecen de toda o parte de la región que contiene los motivos de fibronectina del tipo III (FNIII), pueden tener mayor afinidad de unión a los ligandos de Tek que los polipéptidos que comprenden el dominio extracelular de longitud completa de Tek.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido que comprende el dominio extracelular de Tek, mostrado como los restos 19-745 de SEC ID N.<sup>º</sup>:1, en que el polipéptido carece de los restos 473-745 de SEC ID N.<sup>º</sup>:2 que contienen los motivos de fibronectina del tipo III (FNIII) y en que el polipéptido presenta una mayor afinidad de unión a angiopoyetina-1 o angiopoyetina-2 o angiopoyetina-4 que un polipéptido que comprende el dominio extracelular de longitud completa de Tek.

El dominio extracelular de Tek puede seleccionarse del grupo que consta de:

- (a) los restos 23-472 de SEC ID N.<sup>º</sup>:2;
- (b) variantes que son idénticas a (a) al menos en el 95%;
- (c) variantes que son idénticas a (c) al menos en el 98%;
- (d) variantes que son idénticas a (a) al menos en el 99%; y
- (e) los restos 19-42 de SEC ID N.<sup>º</sup>:2.

El polipéptido puede constar de los restos 19-704 ó 23-704 de la SEC ID N.<sup>º</sup>:2.

La invención abarca también los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos según la invención y los polipéptidos producidos por la expresión de un ácido nucleico tal en una célula huésped recombinante en las condiciones que permiten la expresión del polipéptido.

En algunas realizaciones preferidas, el antagonista de Tek es un multímero del polipéptido Tek soluble de la invención, preferentemente un dímero o trímero y que, con la mayor preferencia, comprende un polipéptido Fc o una cremallera de leucina. El Tek es preferentemente un Tek humano.

La invención proporciona también el uso de un polipéptido de la invención o de un multímero de Tek soluble de la invención para la fabricación de un medicamento para usar en la inhibición de la angiogénesis. En algunas realizaciones preferidas el Tek es humano y el medicamento comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El medicamento puede usarse en el tratamiento de una enfermedad o afección mediadas por angiogénesis, con la mayor preferencia de un tumor sólido o de una enfermedad o afección caracterizados por neovascularización ocular.

En algunas realizaciones el medicamento comprende además un segundo agente quimioterapéutico y/o es apropiado para el uso en combinación con radiación. El segundo agente quimioterapéutico puede seleccionarse del grupo que consta de agentes alquilantes, antimetabolitos, alcaloides de la vinca y otros agentes quimioterapéuticos derivados de vinca y otras plantas, nitrosoureas, antibióticos antitumorales, enzimas antitumorales, inhibidores de topoisomerasa, análogos de platino, supresores adrenocorticales, hormonas, agonistas de hormonas, antagonistas de hormonas, anticuerpos, agentes inmunoterapéuticos, factores de células sanguíneas, agentes radioterapéuticos y modificadores de respuestas biológicas, y con mayor preferencia puede seleccionarse del grupo que consta de cisplatino, ciclofosfamida, mecloretamina, melfalán, bleomicina, carboplatino, fluorouracilo, 5-fluorodesoxiuridina, metotrexato, taxol, asparraginasa, vincristina y vinblastina, linfoquinas y citoquinas como interleucinas, interferones (incluyendo alfa, beta o delta) y TNF, clorambucilo, busulfano, carmustina, lomustina, semustina, estreptozocina, dacarbacina, citarabina, mercaptopericina, tioguanina, vindesina, etopósido, tenipósido, dactinomicina, daunorrúbicina, doxorrúbicina, bleomicina, plicamicina, mitomicina, L-asparaginasa, hidroxurea, metilhidracina, mitotano, tamoxifeno y fluoximesterona, ligando de Flt3, ligando de CD40, interleucina-2, interleucina-12, ligando de 4-1BB, anticuerpos anti-4-1BB, antagonistas de TNF y antagonistas del receptor de TNF, TRAIL, agonistas de CD148, antagonistas de VEGF y antagonistas del receptor de VEGF.

Estos y otros aspectos de la presente invención se harán evidentes haciendo referencia a los dibujos y la descripción detallada siguientes.

## Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la inhibición de la migración celular endotelial por Tek472/Fc en un ensayo de cierre de herida.

La figura 2 muestra la inhibición de la angiogénesis por Tek472/Fc en un ensayo de bolsa corneal.

# ES 2 262 518 T5

La figura 3 muestra el crecimiento tumoral después del tratamiento con Tek472/Fc, Flt3L y combinaciones de Tek472/Fc y Flt3L en ratones con tumores del fibrosarcoma 87.

5 La figura 4 muestra el crecimiento tumoral después del tratamiento con Tek472/Fc, Flt3L y combinaciones de Tek472/Fc y Flt3L en ratones con tumores del fibrosarcoma B10.2.

La figura 5 muestra la unión de Tek472/Fc y Tek745/Fc a la angiopoyetina-2 humana.

## Descripción detallada de la invención

10 La presente invención se dirige a antagonistas de Tek y al uso de los antagonistas de Tek para inhibir la angiogénesis u otras respuestas mediadas por Tek en un mamífero. Los antagonistas de Tek son compuestos o composiciones que interfieren con una o varias de las actividades biológicas de Tek, incluyendo la unión de ligandos y la transducción de señales y pueden caracterizarse usando procedimientos tales como los que se ilustran a continuación. Los antagonistas 15 de Tek incluyen fragmentos del dominio extracelular de Tek y multímeros de Tek solubles. La clonación molecular de un ADNc que codifica el Tek humano (ork, Tie2) se describe en la patente de EE.UU. nº 5.447.860.

### A. Abreviaturas y terminología usadas en la memoria descriptiva

20 “4-1BB” y “ligando de 4-1BB” (4-1BB-L) son polipéptidos descritos, entre otros, en la patente de EE.UU.: nº 5.674.704, incluyendo las formas solubles de los mismos.

“bFGF” es el factor básico de crecimiento de fibroblastos.

25 “BSA” es albúmina de suero bovino.

“Ligando de CD40” (CD40L) es un polipéptido descrito, entre otros, en la patente de EE.UU. nº 5.716.805, incluyendo las formas solubles del mismo.

30 “CHO” es una línea celular de ovario de hámster chino.

“DMEM” es el medio de Eagle modificado por Dulbecco, un medio de cultivo de células disponible comercialmente.

35 “ELISA” es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas.

“Flt3L” es el ligando de Flt3, un polipéptido descrito, entre otros, en la patente de EE.UU. nº 5554512, incluyendo las formas solubles del mismo.

40 “HMVEC-d” son células endoteliales microvasculares primarias de piel humana.

“HRMEC” son células endoteliales microvasculares primarias de riñón humano.

45 “HUVEC” es una línea celular endotelial de la vena umbilical humana.

“mAb” es un anticuerpo monoclonal.

“MSA” es albúmina de suero de ratón.

50 “PBS” es solución salina tamponada con fosfato.

“PE” es ficoeritrina.

55 “PMA” es 12-miristato-13-acetato de forbol.

“RTK” son receptores tirosinaquinasa.

“TNF” es un factor de necrosis tumoral. “TNFR/Fc” es un polipéptido de fusión entre el receptor de TNF y Fc.

60 “TRAIL” es un ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF, un polipéptido transmembrana del tipo II en la familia de TNF, descrito, entre otros, en la patente de EE.UU. nº 5.763.223, incluyendo las formas solubles del mismo.

“VEGF” es el factor de crecimiento endotelial vascular.

### B. Polipéptidos Tek solubles

En un aspecto de la presente invención, un polipéptido Tek soluble se usa como antagonista de Tek para inhibir la angiogénesis o para inhibir la unión a Tek de un ligando de Tek.

## ES 2 262 518 T5

Los polipéptidos solubles pueden ser secretados por las células en las que se expresan. El uso de formas solubles de polipéptidos es ventajoso para ciertas aplicaciones. La purificación de los polipéptidos a partir de células huésped recombinantes se facilita dado que los polipéptidos se secretan y las proteínas solubles son adecuadas generalmente para la administración por vía parenteral. Un polipéptido soluble secretado puede identificarse (y distinguirse de sus homólogos no solubles unidos a la membrana) mediante la separación de las células intactas que expresan el polipéptido deseado del medio de cultivo, por ejemplo por centrifugación, y el análisis del medio (sobrenadante) para determinar la presencia del polipéptido deseado. La presencia del polipéptido deseado en el medio indica que el polipéptido ha sido secretado por las células y, por tanto, es una forma soluble de dicho polipéptido. Los polipéptidos solubles pueden prepararse por cualquiera de una serie de técnicas convencionales. Una secuencia de ADN que codifica un polipéptido soluble deseado puede subclonarse en un vector de expresión para la producción del polipéptido, o el fragmento de ADN codificante deseado puede sintetizarse químicamente.

Los polipéptidos Tek solubles comprenden la totalidad o parte del dominio extracelular de Tek, pero generalmente carecen del dominio transmembrana que causaría la retención del polipéptido en la superficie celular. Los polipéptidos solubles pueden incluir parte del dominio transmembrana o todo o parte del dominio citoplasmático siempre y cuando el polipéptido sea secretado por la célula en la que se produce. Los polipéptidos Tek solubles comprenden ventajosamente un péptido señal nativo o heterólogo al ser sintetizados inicialmente para estimular la secreción por la célula, pero la secuencia señal se escinde al producirse la secreción. El término "dominio extracelular de Tek" pretende abarcar todo o parte del dominio extracelular del Tek nativo, así como formas relacionadas, incluyendo, pero sin limitarse a: (a) fragmentos, (b) variantes, (c) derivados y (d) polipéptidos de fusión. La capacidad de estas formas relacionadas para inhibir la angiogénesis u otras respuestas mediadas por Tek puede determinarse *in vitro* o *in vivo*, usando procedimientos como los que se ilustran a continuación o usando otros ensayos conocidos en la técnica.

Ejemplos de polipéptidos Tek solubles se ofrecen en los ejemplos siguientes. Como se describe en los ejemplos, los inventores descubrieron inesperadamente que ciertos fragmentos del dominio extracelular de Tek se unen a los ligandos de Tek mejor que el dominio extracelular de longitud completa de Tek, que estos fragmentos pueden usarse, por tanto, como antagonistas para bloquear la unión a Tek (por ejemplo, el Tek que se encuentra en la superficie de una célula) de los ligandos de Tek, y que los anticuerpos contra estos fragmentos pueden usarse también como antagonistas para bloquear la unión a Tek de los ligandos de Tek. En algunas realizaciones de la presente invención, una forma multimérica de un polipéptido Tek soluble ("multímero de Tek soluble") se usa como antagonista para bloquear la unión a Tek de los ligandos de Tek para inhibir la angiogénesis u otras respuestas mediadas por Tek.

### C. Multímeros de Tek soluble

Los multímeros de Tek solubles son multímeros ligados covalentemente o no covalentemente, incluyendo dímeros, trímeros o multímeros de mayor orden. Los multímeros pueden estar ligados por puentes disulfuro formados entre restos de cisteína en diferentes polipéptidos Tek solubles. Una realización de la invención se dirige a multímeros que comprenden múltiples polipéptidos Tek solubles unidos por medio de interacciones covalentes o no covalentes entre fracciones peptídicas fusionadas a los polipéptidos Tek solubles. Estos péptidos pueden ser ligadores peptídicos (espaciadores), o péptidos que tienen la propiedad de estimular la multimerización. Las cremalleras de leucina y ciertos polipéptidos derivados de anticuerpos se encuentran entre los péptidos que pueden estimular la multimerización de los polipéptidos Tek solubles unidos a ellos, como se describe con más detalle a continuación. En realizaciones especiales, los multímeros comprenden de dos a cuatro polipéptidos Tek solubles.

En algunas realizaciones se prepara un multímero de Tek soluble usando polipéptidos derivados de inmunoglobulinas. La preparación de proteínas de fusión que comprenden ciertos polipéptidos heterólogos fusionados a diversas porciones de polipéptidos derivados de anticuerpos (incluyendo el dominio Fc) ha sido descrita, por ejemplo, por Ashkenazi y col. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535, 1991); Byrn y col. (Nature 344:677, 1990); y Hollenbaugh y Aruffo ("Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", en Current Protocols in Immunology, supl. 4, páginas 10.19.1-10.19.11, 1992).

Una realización preferida de la presente invención se dirige a un dímero Tek/Fc que comprende dos proteínas de fusión creadas por la fusión de Tek soluble a un polipéptido Fc. Una fusión génica que codifica la proteína de fusión Tek/Fc se inserta en un vector de expresión adecuado. Las proteínas de fusión Tek/Fc se expresan en células huésped transformadas con el vector de expresión recombinante y se dejan ensamblar de forma similar a moléculas de anticuerpos, con lo que se forman puentes disulfuro intercatenarios entre las fracciones Fc para producir un Tek soluble divalente. El término "polipéptido Fc" como se usa en este documento incluye las formas nativas y muteínas de polipéptidos derivados de la región Fc de un anticuerpo. También se incluyen formas truncadas de dichos polipéptidos que contienen la región bisagra que estimula la dimerización.

Un polipéptido Fc apropiado, descrito en la solicitud PCT WO 93/10151, es un polipéptido monocatenario, que se extiende desde la región bisagra N-terminal al extremo C nativo de la región Fc de un anticuerpo IgG1 humano. Otro polipéptido Fc útil es la muteína Fc descrita en la patente de EE.UU. n° 5457035 y por Baum y col., EMBO J. 13:3992, 1994. La secuencia de aminoácidos de esta muteína es idéntica a la secuencia del Fc nativo presentada en el documento WO 93/10151, excepto porque el aminoácido 19 se ha cambiado de Leu a Ala, el aminoácido 20 se ha cambiado de Leu a Glu y el aminoácido 22 se ha cambiado de Gly a Ala. La muteína muestra una afinidad reducida por los receptores de Fc. Los polipéptidos de fusión que comprenden restos Fc, y los multímeros formados a partir de los mismos, ofrecen la ventaja de su fácil purificación por cromatografía de afinidad sobre columnas de

# ES 2 262 518 T5

proteína A o proteína G, y los polipéptidos de fusión con Fc pueden proporcionar una semivida más larga *in vivo* que los polipéptidos no modificados, lo que es de utilidad en aplicaciones terapéuticas.

En otras realizaciones, un polipéptido Tek soluble puede sustituirse por la porción variable de la cadena pesada o ligera de un anticuerpo. Si se preparan proteínas de fusión con las dos cadenas, pesada y ligera, de un anticuerpo, es posible formar un multímero de Tek soluble con hasta cuatro polipéptidos Tek solubles.

Alternativamente, el multímero de Tek soluble es una proteína de fusión que comprende múltiples polipéptidos Tek solubles, con o sin ligadores peptídicos (espaciadores), o péptidos que tienen la propiedad de estimular la multimerización. Entre los ligadores peptídicos apropiados se encuentran los descritos en las patentes de EE.UU. nº 4751180, nº 4935233 y nº 5073627. Una secuencia de ADN que codifica un ligador peptídico deseado puede insertarse entre, y en el mismo marco de lectura, que las secuencias de ADN que codifican Tek, usando las técnicas convencionales conocidas en la materia. Por ejemplo, un oligonucleótido sintetizado químicamente que codifica el ligador puede ligarse entre las secuencias que codifican Tek soluble. En realizaciones especiales, una proteína de fusión comprende de dos a cuatro polipéptidos Tek solubles, separados por ligadores peptídicos.

Otro procedimiento para preparar multímeros de Tek solubles implica el uso de un dominio de cremallera de leucina. Los dominios de cremallera de leucina son péptidos que estimulan la multimerización de las proteínas en las que se encuentran. Las cremalleras de leucina se identificaron originalmente en varias proteínas que se unen a ADN (Landschulz y col., Science 240:1759, 1988) y desde entonces se han encontrado en una diversidad de proteínas diferentes. Entre las cremalleras de leucina conocidas se encuentran péptidos que se producen de forma natural y derivados de los mismos que se dimerizan o trimerizan. Ejemplos de dominios de cremallera de leucina apropiados para producir proteínas multiméricas solubles se describen en la solicitud PCT WO 94/10308, y la cremallera de leucina derivada de la proteína tensioactiva D de pulmón (SPD), descrita en Hoppe y col., FEBS Lett. 344:191, 1994. El uso de una cremallera de leucina modificada que permite la trimerización estable de una proteína heteróloga fusionada con la misma se describe en Fanslow y col., Semin. Immunol. 6:267, 1994. Las proteínas de fusión recombinantes que comprenden un polipéptido Tek soluble fusionadas a un péptido cremallera de leucina se expresan en células huésped apropiadas y el multímero de Tek soluble que se forma se recupera del sobrenadante del cultivo.

Para algunas aplicaciones se cree que los multímeros de Tek solubles de la presente invención ofrecen ciertas ventajas sobre el uso de las formas monoméricas, incluyendo la ventaja de imitar la interacción natural entre un ligando y un receptor tirosinaquinasa (RTK). En general, un ligando dimérico se unirá, y causará dimerización del RTK (van der Geer y col., Ann. Rev. Cell Biol. 10:251, 1994). Esta unión de alta afinidad causa la transfosforilación del RTK y el comienzo del proceso de transducción de señales. La unión de un multímero de Tek soluble puede tener lugar con mayor afinidad que la de un monómero de Tek soluble. Los polipéptidos de fusión con Fc ofrecen una ventaja adicional en que esta forma muestra típicamente un aumento de la semivida *in vivo* en comparación con un polipéptido sin modificar.

La presente invención abarca el uso de varias formas de multímeros de Tek solubles que retienen la capacidad para inhibir la angiogénesis u otras respuestas mediadas por Tek. El término "multímero de Tek soluble" pretende abarcar multímeros que contienen todo o parte del dominio extracelular del Tek nativo, así como formas relacionadas que incluyen, pero no se limitan a, multímeros de: (a) fragmentos, (b) variantes, (c) derivados y (d) polipéptidos de fusión de Tek soluble. La capacidad de estas formas relacionadas para inhibir la angiogénesis u otras respuestas mediadas por Tek puede determinarse *in vitro* o *in vivo*, usando procedimientos como los que se ilustran en los ejemplos o usando otros ensayos conocidos en la materia.

Entre los polipéptidos Tek solubles y multímeros de Tek solubles útiles en la práctica de la presente invención se encuentran variantes que retienen la capacidad de unirse a ligandos y/o inhibir la angiogénesis u otras respuestas mediadas por Tek. Estas variantes de Tek incluyen polipéptidos que son sustancialmente homólogos al Tek nativo, pero que tienen una secuencia de aminoácidos diferente de la del Tek nativo debido a una o varias delecciones, inserciones o sustituciones. Realizaciones especiales incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos Tek que comprenden de una a diez delecciones, inserciones o sustituciones de restos de aminoácidos, en comparación con una secuencia nativa de Tek. Se incluyen como variantes de los polipéptidos Tek aquellas variantes que se producen de forma natural, tales como formas alélicas y formas de corte y empalme alternativo, así como variantes que se han construido por modificación de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido Tek o de la secuencia nucleotídica de un ácido nucleico que codifica un polipéptido Tek.

Generalmente, las sustituciones de uno o varios aminoácidos presentes en el polipéptido nativo deberán llevarse a cabo de forma conservadora. Ejemplos de sustituciones conservadoras incluyen la sustitución de aminoácidos fuera del(los) dominio(s) activo(s) y sustituciones de aminoácidos que no alteran la estructura secundaria y/o terciaria de Tek. Ejemplos adicionales incluyen la sustitución de restos alifáticos entre sí, como Ile, Val, Leu o Ala entre sí, o sustituciones de restos polares entre sí, como entre Lys y Arg; Glu y Asp; o Gln y Asn, o sustituciones de restos aromáticos entre sí, como Phe, Trp o Tyr entre sí. Otras de estas sustituciones conservadoras se conocen en la materia, por ejemplo, sustituciones de regiones completas con similares características de hidrofobicidad.

La secuencia nativa del dominio extracelular de longitud completa de Tek se presenta como los restos 23-745 de SEC ID N.º:1. El porcentaje de identidad, tanto en el caso de polipéptidos como de ácidos nucleicos puede determinarse por inspección visual. El porcentaje de identidad puede determinarse también usando el procedimiento de

# ES 2 262 518 T5

alineamiento de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48:443, 1970), en la revisión de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math. 2:482, 1981). Preferentemente, el porcentaje de identidad se determina usando un programa de ordenador, por ejemplo el programa de ordenador GAP, en la versión 10.x, de Genetics Computer Group (GCG; Madison, WI, véase también Devereux y col., Nucl. Acids Res. 12:387, 1984). Los parámetros por defecto preferidos para el programa

- 5 GAP incluyen: (1) una matriz de comparación unaria (que contiene un valor de 1 para las identidades y 0 para las no identidades) para nucleótidos y la matriz de comparación ponderada de Gribskov y Burgess, Nucl. Acids Res. 14:6745, 1986, como se describe en Schwartz y Dayhoff, eds., Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, págs. 353-358, 1979, para aminoácidos; (2) una penalización de 30 (aminoácidos) o 50 (nucleótidos) para cada hueco y una penalización adicional de 1 (aminoácidos) o 3 (nucleótidos) para cada símbolo en 10 cada hueco; (3) sin penalización para los huecos finales; y (4) sin penalización máxima para huecos grandes. También 15 pueden usarse otros programas usados por el experto en la materia de la comparación de secuencias. Para fragmentos de Tek, el porcentaje de identidad se calcula basado en aquella porción de Tek que está presente en el fragmento.

La presente invención abarca además el uso de polipéptidos Tek solubles con o sin glicosilación de patrón nativo 15 asociada. El Tek expresado en sistemas de expresión de levaduras o de mamíferos (por ejemplo células COS-1 o COS-7) puede ser similar o significativamente diferente de un polipéptido Tek nativo en cuanto a peso molecular y patrón de glicosilación, dependiendo del sistema de expresión elegido. La expresión de polipéptidos Tek en sistemas de expresión bacterianos, como *E. coli*, proporciona moléculas sin glicosilar. Células huésped diferentes pueden también 20 procesar polipéptidos de forma diferente, resultando en mezclas heterogéneas de polipéptidos con extremos N o C variables.

La estructura primaria de aminoácidos de los polipéptidos Tek solubles puede modificarse para crear derivados mediante la formación de conjugados covalentes o agregativos con otras fracciones químicas, tal como grupos glicosilo, lípidos, fosfatos, grupos acetilo y otros similares. Los derivados covalentes de Tek pueden prepararse mediante el 25 ligamiento de grupos funcionales concretos a las cadenas laterales de aminoácidos de Tek o a los extremos N o C de un polipéptido Tek.

Los polipéptidos de fusión de Tek soluble de utilidad en la práctica de la invención incluyen también conjugados covalentes o agregativos de un polipéptido Tek con otros polipéptidos añadidos para proporcionar nuevas entidades 30 polifuncionales.

## D. Producción recombinante de polipéptidos Tek

Los polipéptidos Tek, incluyendo polipéptidos, fragmentos y polipéptidos de fusión de Tek soluble, usados en la 35 presente invención pueden prepararse usando un sistema de expresión recombinante. Las células huésped transformadas con un vector de expresión recombinante (“células huésped recombinantes”) que codifican el polipéptido Tek se cultivan en condiciones que estimulan la expresión de Tek y se recupera dicho Tek. Los polipéptidos Tek pueden producirse también en plantas o animales transgénicos o por síntesis química.

40 La invención abarca las moléculas de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos Tek usados en la invención, incluyendo los ácidos nucleicos que codifican los restos 23-472 de SEC ID N.<sup>o</sup>:2. El ácido nucleico puede además codificar la secuencia de un péptido señal y puede codificar SEC ID N.<sup>o</sup>:2.

45 Debido a la degeneración del código genético, puede haber una variación considerable en las secuencias nucleotídicas que codifican la misma secuencia de aminoácidos. También se describen secuencias de ácidos nucleicos capaces de hibridar en condiciones moderadamente restrictivas (por ejemplo, disolución de prelavado de 5 X SSC, SDS al 0,5%, EDTA 1,0 mM (pH 8,0) y condiciones de hibridación de 50°C, 5 X SSC, durante la noche) a las secuencias de ADN que codifican Tek. El experto en la materia puede determinar combinaciones adicionales de sal y temperatura que constituyen una restricción moderada de la hibridación (véase también Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982; y Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley and Sons, 1989 y versiones posteriores). Las condiciones de mayor restricción incluyen temperaturas más altas para la hibridación 50 y los lavados después de la hibridación y/o menor concentración de sal. El porcentaje de identidad de los ácidos nucleicos puede determinarse usando los procedimientos descritos anteriormente para los polipéptidos, es decir, por 55 procedimientos que incluyen la inspección visual y el uso de programas de ordenador como GAP.

60 Para la producción de Tek recombinante puede emplearse cualquier sistema de expresión apropiado. Los vectores de expresión recombinantes incluyen el ADN que codifica un polipéptido Tek ligado de forma operativa a secuencias nucleotídicas de regulación transcripcional y traduccional apropiadas, tales como las que se derivan de un gen de mamíferos, microbiano, vírico o de insectos. Las secuencias nucleotídicas están ligadas operativamente cuando la secuencia reguladora está funcionalmente relacionada con la secuencia de ADN de Tek. Por tanto, una secuencia nucleotídica promotora está ligada operativamente a la secuencia de ADN de Tek si la secuencia nucleotídica promotora controla la transcripción de la secuencia de ADN de Tek. Ejemplos de secuencias reguladoras incluyen promotores, 65 operadores o potenciadores transcripcionales, un sitio de unión del ARNm a ribosomas y secuencias apropiadas que controlan la iniciación y terminación de la transcripción y la traducción. Una secuencia que codifica un péptido señal apropiado (nativo o heterólogo) puede incorporarse a los vectores de expresión. Una secuencia de ADN para un péptido señal (a la que se hace referencia por una diversidad de nombres incluyendo líder secretor, péptido líder o líder) puede fusionarse manteniendo el marco de lectura a la secuencia de Tek, de modo que el polipéptido Tek se

## ES 2 262 518 T5

traduce inicialmente como una proteína de fusión que comprende el péptido señal. Un péptido señal que es funcional en las células huésped deseadas estimula la secreción extracelular del polipéptido Tek. El péptido señal se escinde del polipéptido Tek al ser éste secretado por la célula.

5 Las células huésped apropiadas para la expresión de los polipéptidos Tek incluyen procariotas, levaduras y células de eucariotas superiores, incluyendo células de mamíferos y de insectos. Los vectores de clonación y expresión apropiados para usar en células bacterianas, de hongos, levaduras, insectos y mamíferos se describen, por ejemplo, en Pouwels y col. *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, Nueva York, 1985.

10 Los procariotas incluyen organismos gram negativos o gram positivos, por ejemplo, *E. coli* o *Bacilli*. Las células huésped procarióticas apropiadas para transformación incluyen, por ejemplo, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* y diversas otras especies dentro de los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Staphylococcus*. En una célula huésped procariótica, como *E. coli*, los polipéptidos Tek pueden incluir un resto de metionina N-terminal para facilitar la expresión del polipéptido recombinante en la célula huésped procariótica. La Met N-terminal puede escindirse del 15 polipéptido recombinante expresado.

Los vectores de expresión para usar en células huésped procarióticas comprenden generalmente uno o varios genes marcadores de fenotipo seleccionable. Un gen marcador de fenotipo seleccionable es, por ejemplo, un gen que codifica una proteína que confiere resistencia a un antibiótico o que suple un requerimiento autotrófico. Ejemplos de vectores 20 de expresión útiles para células huésped procarióticas incluyen aquellos derivados de plásmidos disponibles comercialmente como el vector de clonación pBR322 (ATCC 37017). pBR322 contiene genes para resistencia a ampicilina y tetraciclina y, por tanto, ofrece un modo sencillo de identificar las células transformadas. Un promotor apropiado y una secuencia de ADN de Tek se insertan en el vector pBR322. Otros vectores disponibles comercialmente incluyen, por ejemplo, pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) y pGEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, EEUU).

25 Las secuencias promotoras usadas normalmente para los vectores de expresión en células huésped procarióticas incluyen  $\beta$ -lactamasa (penicilinasa), el sistema promotor de la lactosa (Chang y col., *Nature* 275:615, 1978; Goeddel y col., *Nature* 281:544, 1979), el sistema promotor del triptófano (trp) (Goeddel y col., *Nucl. Acids Res.* 8:4057, 1980; documento EPA 36776) y el promotor tac (Maniatis, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor 30 Laboratory, p. 412, 1982). Un sistema de expresión en células huésped procarióticas especialmente útil emplea un promotor del fago  $\lambda$   $P_L$  y una secuencia represora termolábil de cI857ts. Los vectores plasmídicos disponibles en la colección American Type Culture Collection que incorporan derivados del promotor de  $\lambda$   $P_L$  incluyen el plásmido pHUB2 (residente en la cepa JMB9 de *E. coli*, ATCC 37092) y pPLc28 (residente en *E. coli* RR1, ATCC 53082).

35 Los polipéptidos Tek pueden expresarse también en células huésped de levaduras, preferentemente del género *Saccharomyces* (por ejemplo *S. cerevisiae*). Pueden emplearse también otros géneros de levaduras, como *Pichia* o *Kluyveromyces*. Los vectores de levaduras contendrán frecuentemente una secuencia del origen de replicación de un 40 plásmido de 2 $\mu$ m de levaduras, una secuencia de replicación autónoma (ARS), una región promotora, secuencias para poliadenilación, secuencias para terminación de la transcripción y un gen marcador seleccionable. Las secuencias promotoras apropiadas para vectores de levaduras incluyen, entre otras, los promotores de metalotioneína, 3-fosfogliceratoquinasa (Hitzeman y col., *J. Biol. Chem.* 255:2073, 1980) u otras enzimas glicolíticas (Hess y col., *J. Adv. Enzyme Reg.* 7:149, 1968; Holland y col., *Biochem.* 17:4900, 1978) como enolasa, gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvatodescarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfatoisomerasa, 3-fosfogliceratromutasa, piruvatoquinasa, triosafosfatoisomerasa, fosfoglucoisomerasa y glucoquinasa. Otros vectores y promotores apropiados para usar en la expresión en levaduras se describen adicionalmente en Hitzeman, documento EPA 73657. Otra alternativa es el promotor de ADH2 reprimible por glucosa, descrito por Russell y col., (*J. Biol. Chem.* 258:2674, 1982) y Beier y col., (*Nature* 300:724, 1982). Vectores lanzadera que se pueden replicar tanto en levaduras como en *E. coli* pueden construirse mediante la inserción de secuencias de ADN de pBR322 para la selección y la replicación en *E. coli* (gen Amp<sup>r</sup> y origen de replicación) en los vectores de levaduras descritos anteriormente.

50 La secuencia líder del factor  $\alpha$  de levaduras puede emplearse para dirigir la secreción de los polipéptidos recombinantes. La secuencia líder del factor  $\alpha$  se inserta frecuentemente entre la secuencia promotora y la secuencia del gen estructural. Véase por ejemplo, Kurjan y col., *Cell* 30:933, 1982; Bitter y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:5330, 1984. Otras secuencias líder apropiadas para facilitar la secreción de polipéptidos recombinantes por las levaduras huésped son conocidas por los expertos en la materia. Una secuencia líder puede modificarse cerca de su extremo 3' para contener uno o varios sitios de restricción. Esto facilitará la fusión de la secuencia líder al gen estructural.

55 Los protocolos de transformación de levaduras son conocidos por los expertos en la materia. Uno de estos protocolos es el descrito por Hinnen y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1929, 1978. El protocolo de Hinnen y col. selecciona transformantes Trp<sup>+</sup> en un medio selectivo, en que el medio selectivo consta de base nitrogenada para levaduras al 0,67%, casaminoácidos al 0,5%, glucosa al 2%, 10  $\mu$ g/ml de adenina y 20  $\mu$ g/ml de uracilo.

60 Las células huésped de levaduras transformadas por vectores que contienen una secuencia promotora de ADH2 pueden crecerse en un medio "rico" para inducir la expresión. Un ejemplo de un medio rico es uno que consta de extracto de levadura al 1%, peptona al 2% y glucosa al 1%, suplementado con 80  $\mu$ g/ml de adenina y 80  $\mu$ g/ml de uracilo. La desrepresión del promotor de ADH2 se produce cuando se agota la glucosa del medio.

## ES 2 262 518 T5

Los sistemas de cultivos de células huésped de insectos pueden emplearse también para expresar polipéptidos Tek recombinantes, incluyendo polipéptidos Tek solubles. Los sistemas de baculovirus para la producción de polipéptidos heterólogos en células de insectos se revisan en Luckow y Summers, Bio/Technology 6:47, 1988.

- 5 Las células de mamíferos se prefieren especialmente para usar como células huésped. Ejemplos de líneas celulares huésped de mamíferos apropiadas incluyen la línea COS-7 de células de riñón de mono (ATCC CRL 1651) (Gluzman y col., Cell 23:175, 1981), células L, células C127, células 3T3 (ATCC CCL 163), células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa y líneas celulares BHK (ATCC CRL 10) y la línea celular CV1/EBNA derivada de la línea celular de riñón del mono verde africano CV1 (ATCC CCL 70), como describe McMahan y col. (EMBO J. 10:2821, 10 1991). Para la producción de polipéptidos terapéuticos es especialmente ventajoso el uso de una línea celular huésped de mamíferos que se ha adaptado al crecimiento en un medio que no contiene proteínas animales.

Se han descrito procedimientos establecidos para introducir ADN en células de mamíferos (Kaufman, R.J., Large Scale Mammalian Cell Culture, 1990, págs. 15-69). Para transfectar las células pueden usarse protocolos adicionales usando reactivos disponibles comercialmente, como Lipofectamina (Gibco/BRL) o Lipofectamina-Plus (Feigner y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413, 1987). Además, para transfectar células de mamíferos puede usarse electroporación usando procedimientos convencionales, como los descritos en Sambrook y col. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2 ed. vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). La selección de los transformantes estables puede realizarse usando procedimientos conocidos en la materia, como por ejemplo, la resistencia a fármacos citotóxicos. Kaufman y col., Meth. in Enzymology 185:487, 1990 describen varios esquemas de selección como la resistencia a dihidrofolato-reductasa (DHFR). Una cepa huésped apropiada para la selección por DHFR puede ser la cepa de CHO, DX-B11, que es deficiente en DHFR (Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216, 1980). Un plásmido que expresa el ADNc de DHFR puede introducirse en la cepa DX-B11 y sólo las células que contienen el plásmido pueden crecer en el medio selectivo apropiado. Otros ejemplos de marcadores seleccionables que pueden 20 incorporarse en un vector de expresión incluyen secuencias de ADNc que confieren resistencia a antibióticos, como G418 e higromicina B. Las células que contienen el vector pueden seleccionarse en función de la resistencia a estos compuestos.

Las secuencias de control transcripcional y traducional para los vectores de expresión en células huésped de 30 mamíferos pueden extraerse de genomas víricos. Las secuencias promotoras y potenciadoras usadas normalmente derivan del virus del polioma, adenovirus 2, virus simio 40 (SV40) y citomegalovirus humano. Las secuencias de ADN derivadas del genoma vírico de SV40, por ejemplo, el origen de SV40, promotores temprano y tardío, potenciador, sitios de corte y empalme y de poliadenilación pueden usarse para suministrar otros elementos genéticos para la expresión de la secuencia de un gen estructural en una célula huésped de mamífero. Los promotores víricos temprano y 35 tardío son especialmente útiles porque los dos se obtienen fácilmente a partir de un genoma vírico como un fragmento, que puede contener también un origen de replicación viral (Fiers y col., Nature 273:113, 1978; Kaufman, Meth. in Enzymology, 1990). Pueden usarse también fragmentos de menor o de mayor tamaño de SV40, siempre que se incluya la secuencia de bases de aproximadamente 250 pb que se extiende desde el sitio *Hind*III hacia el sitio *Bg*II situados en el origen de replicación vírico de SV40.

40 Secuencias de control adicionales, que muestran un aumento de la expresión de genes heterólogos en vectores de expresión de mamíferos, incluyen elementos tales como el elemento de secuencia de aumento de la expresión (EASE), derivado de las células CHO (Morris y col., Animal Cell Technology, 1997, págs. 529-534) y los ARN del líder tripartito (TPL) y del gen VA de adenovirus 2 (Gingeras y col., J. Biol. Chem. 257:13475, 1982). Las secuencias 45 del sitio interno de entrada a los ribosomas (IRES) de origen vírico permiten la traducción eficiente de los ARNm dicistrónicos (Oh y Sarnow, Current Opinion in Genetics and Development 3:295, 1993; Ramesh y col., Nucleic Acids Research 24:2697, 1996). Se ha demostrado que la expresión de un ADNc heterólogo como parte de un ARNm dicistrónico seguido por el gen para un marcador seleccionable (por ejemplo DHFR) aumenta la transfectabilidad 50 del huésped y la expresión del ADNc heterólogo (Kaufman, Meth. in Enzymology, 1990). Ejemplos de vectores de expresión que emplean ARNm dicistrónicos son pTR-DC/GFP, descrito por Mosser y col., Biotechniques 22:150, 1997, y p2A5I, descrito por Morris y col., Animal Cell Technology, 1997, págs. 529-534.

Un vector útil de alta expresión, pCAVNOT, ha sido descrito por Mosley y col., Cell 59:335, 1989. Otros vectores 55 de expresión para usar células huésped de mamíferos pueden construirse como describen Okayama y Berg (Mol. Cell. Biol. 3:280, 1983). Un sistema útil para un alto nivel de expresión estable de ADNc de mamíferos en las células epiteliales murinas de mama C127, puede construirse sustancialmente como describen Cosman y col. (Mol. Immunol. 23:935, 1986). Un vector útil de alta expresión, PMLSV N1/N4, descrito por Cosman y col., Nature 312:768, 1984, ha sido depositado como ATCC 39890. Otros vectores útiles de expresión en mamíferos son conocidos en la materia.

60 En cuanto a los péptidos señal que pueden emplearse en la producción de polipéptidos Tek, puede usarse el péptido señal nativo de Tek o puede reemplazarse por un péptido señal o una secuencia líder heterólogos si se desea. La elección del péptido señal o líder puede depender de factores como el tipo de célula huésped en la que se ha de producir el Tek recombinante. Ejemplos de péptidos señal heterólogos que son funcionales en células huésped de mamíferos incluyen la secuencia señal para la interleucina-7 (IL-7), descrita en la patente de EE.UU. nº 4965195; la secuencia señal para el receptor de la interleucina-2, descrita en Cosman y col., Nature 312:768 (1984); el péptido señal del receptor de la interleucina-4, descrito en el documento EP 367.566; el péptido señal del receptor del tipo I de la interleucina-1, descrito en la patente de EE.UU. nº 4.968.607; y el péptido señal del receptor del tipo II de la interleucina-1, descrito en el documento EP 460.846.

# ES 2 262 518 T5

Mediante el uso de técnicas de ADN recombinante, incluyendo mutagénesis y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el experto en la materia puede producir secuencias de ADN que codifican polipéptidos Tek que comprenden diversas adiciones o sustituciones de restos de aminoácidos o de secuencias, o delecciones de restos o secuencias terminales o internos, incluyendo fragmentos, variantes, derivados y polipéptidos de fusión de Tek.

5 También pueden usarse animales transgénicos, incluyendo ratones, cabras, ovejas y cerdos, y plantas transgénicas, incluyendo tabaco, tomate, legumbres, gramíneas y cereales, como biorreactores para la producción de los polipéptidos Tek, incluyendo polipéptidos Tek solubles. En el caso de los animales transgénicos, es especialmente ventajoso construir un ADN químico que incluye una secuencia codificante de Tek, ligada operativamente a secuencias reguladoras que actúan en posiciones relativas *cis*, que estimulan la expresión del Tek soluble en la leche y/o en otros fluidos corporales (véase por ejemplo patente de EE.UU. nº 5.843.705; patente de EE.UU. nº 5.880.327). En el caso de las plantas transgénicas es especialmente ventajoso producir Tek en un tipo concreto de células, tejido u órgano (véase por ejemplo patente de EE.UU. nº 5.639.947; patente de EE.UU. nº 5.889.189).

10 15 El experto en la materia reconocerá que el procedimiento para la purificación de los polipéptidos Tek solubles expresados variará según el sistema huésped empleado y dependiendo de si el polipéptido recombinante se secreta o no. Los polipéptidos Tek solubles pueden purificarse usando los procedimientos conocidos en la materia, incluyendo una o varias etapas de concentración, precipitación por aumento de la fuerza iónica, intercambio iónico, interacción hidrofóbica, purificación por afinidad, HPLC o cromatografía de exclusión por tamaño. Los polipéptidos de fusión 20 que comprenden fracciones Fc (y los multímeros formados a partir de los mismos) ofrecen la ventaja de su fácil purificación por cromatografía de afinidad sobre columnas de proteína A o proteína G.

## E. Anticuerpos contra Tek

25 Los epítopos antigenicos del dominio extracelular de Tek son de utilidad para la producción de anticuerpos y en particular, los anticuerpos monoclonales bloqueadores descritos con más detalle a continuación. Tales epítopos, o variantes de los mismos, pueden producirse usando técnicas bien conocidas en la materia, como síntesis en fase sólida, escisión química o enzimática de un polipéptido, o usando ingeniería genética. Como se ilustra a continuación, los inventores han determinado que el dominio extracelular de Tek comprende al menos tres epítopos, y que los 30 anticuerpos generados contra una forma delecionada del dominio extracelular de Tek pueden competir con los ligandos de Tek por la unión a Tek.

35 En este documento se describen composiciones y usos de anticuerpos que son inmunorreactivos frente a los polipéptidos Tek. Tales anticuerpos “se unen específicamente” a los polipéptidos Tek, lo que quiere decir que se unen por medio de los puntos de unión al antígeno del anticuerpo, y no mediante las interacciones inespecíficas. Los términos “anticuerpo” y “anticuerpos” se usan en este documento en su sentido más amplio e incluyen, sin limitación, anticuerpos monoclonales y policlonales intactos, así como fragmentos tales como los fragmentos Fv, Fab y F(ab')2, anticuerpos monocatenarios como scFv y diversas combinaciones de cadenas. Los anticuerpos pueden estar humanizados y pueden ser humanos. Los anticuerpos pueden prepararse usando una diversidad de procedimientos bien 40 conocidos, incluyendo, sin limitación, la inmunización de animales con repertorios inmunitarios nativos o transgénicos, la presentación en fagos, el cultivo de hibridomas y de células recombinantes, y biorreactores de las plantas y animales transgénicos.

45 Tanto los anticuerpos policlonales como monoclonales pueden prepararse por técnicas convencionales. Véase por ejemplo, Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Kennet y col. (eds.) Plenum Press, Nueva York (1980); y Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow y Land (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1988).

50 En este documento también se describen líneas celulares de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales específicos para los polipéptidos de la invención. Tales hibridomas pueden producirse e identificarse por técnicas convencionales. Un procedimiento para producir una de estas líneas celulares de hibridoma comprende la inmunización de un animal con un polipéptido, la recolección de las células del bazo del animal inmunizado, la fusión de dichas células del bazo a una línea celular de mieloma, generando con ello células de hibridoma, y la identificación de una línea celular de hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que se une al polipéptido. Los anticuerpos monoclonales 55 producidos por hibridomas pueden recuperarse por técnicas convencionales.

60 Los anticuerpos monoclonales incluyen anticuerpos químicos, por ejemplo, versiones “humanizadas” de anticuerpos producidos originalmente en ratones u otras especies no humanas. Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo modificado que comprende típicamente la región variable de un anticuerpo no humano (por ejemplo, murino) o al menos las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del mismo, y las porciones de inmunoglobulina restantes derivan de un anticuerpo humano. Los procedimientos para la producción de anticuerpos monoclonales químicos y modificados adicionalmente incluyen aquellos descritos por Riechmann y col. (Nature 332:323, 1988), Liu y col. (PNAS 84:3439, 1987), Larrick y col. (Bio/Technology 7:934, 1989) y Winter y Harris (TIPS 14:139, mayo, 1993). Estos anticuerpos inmunizados pueden prepararse por técnicas conocidas y ofrecen la ventaja de su reducida 65 inmunogenicidad al administrarse a seres humanos.

Para la producción de anticuerpos pueden emplearse los procedimientos que se han desarrollado para generar anticuerpos humanos en animales no humanos. Los anticuerpos pueden ser parcialmente humanos o preferentemente

## ES 2 262 518 T5

completamente humanos. Por ejemplo, pueden emplearse ratones transgénicos en los que se ha introducido material genético que codifica una o varias cadenas de inmunoglobulinas humanas. Estos ratones pueden estar alterados genéticamente de forma diversa. La manipulación genética puede resultar en la sustitución de cadenas de inmunoglobulinas endógenas por cadenas polipeptídicas de inmunoglobulinas humanas en, al menos, algunos y preferentemente en casi todos los anticuerpos producidos por el animal después de la inmunización.

Se han preparado ratones en los que se han inactivado uno o varios de los genes de inmunoglobulinas endógenas por procedimientos diversos. Para reemplazar los genes de ratón inactivados se han introducido en los ratones los genes de inmunoglobulinas humanas. Los anticuerpos producidos en los animales incorporan cadenas polipeptídicas de inmunoglobulinas humanas codificadas por el material genético humano introducido en el animal. Ejemplos de técnicas para la producción y uso de estos animales transgénicos para generar anticuerpos (que a veces se denominan "anticuerpos transgénicos") se describen en las patentes de EE.UU. nº 5.814.318, nº 5.569.825 y nº 5.545.806.

### F. Procedimientos terapéuticos

Los polipéptidos descritos pueden usarse para inhibir la angiogénesis u otras respuestas mediadas por Tek en un mamífero con necesidad de tal tratamiento. El término "respuesta mediada por Tek" incluye cualquier respuesta celular, fisiológica u otra respuesta biológica causada, al menos en parte, por la unión a Tek de un ligando de Tek, o que puede ser inhibida o suprimida, en la totalidad o en parte, bloqueando la unión a Tek de un ligando de Tek. El tratamiento se administra ventajosamente para prevenir la aparición o recurrencia de una enfermedad o afección mediada por angiogénesis o para tratar a un mamífero que tiene una enfermedad o afección mediada por angiogénesis. Las enfermedades y afecciones mediadas por angiogénesis incluyen, pero no se limitan a afecciones oculares, afecciones malignas y metastásicas y enfermedades inflamatorias.

Entre las afecciones oculares que pueden tratarse según la presente invención se encuentran enfermedades de los ojos caracterizadas por neovascularización ocular, incluyendo, pero sin limitarse a, retinopatía diabética (una complicación importante de la diabetes), retinopatía en los prematuros (esta devastadora afección ocular, que conduce frecuentemente a problemas crónicos de visión y que supone un elevado riesgo de ceguera, es una grave complicación durante el cuidado de los niños prematuros), glaucoma neovascular, retinoblastoma, fibroplasia retroental, rubeosis, uveitis, degeneración macular y neovascularización de injertos corneales. Otras enfermedades inflamatorias de los ojos, tumores oculares y enfermedades asociadas con neovascularización coroidea o del iris pueden tratarse también según la presente invención.

La presente invención puede usarse también para tratar afecciones malignas y metastásicas como tumores sólidos.

Los tumores sólidos incluyen sarcomas y carcinomas, tanto primarios como metastásicos.

La presente invención puede usarse también para tratar enfermedades inflamatorias, incluyendo, pero sin limitarse a, artritis, reumatismo y psoriasis.

Otras enfermedades y afecciones que pueden tratarse según la presente invención incluyen tumores benignos y afecciones preneoplásicas, angiogénesis del miocardio, articulaciones de hemofílicos, esclerodermia, adhesiones vasculares, neovascularización de la placa aterosclerótica, telangiectasia y granulación de las heridas.

Además de los polipéptidos que comprenden un fragmento del dominio extracelular de Tek, multímeros de Tek solubles y anticuerpos que se unen al dominio extracelular de Tek, también pueden administrarse otras formas de antagonistas de Tek para conseguir un efecto terapéutico. Ejemplos de otras formas de antagonistas de Tek incluyen otros anticuerpos, tales como anticuerpos contra un ligando de Tek, ácidos nucleicos antisentido, ribozimas, mutefñas, aptámeros y moléculas pequeñas dirigidos contra Tek o contra uno o varios de los ligandos de Tek.

Los polipéptidos o multímeros de la presente invención pueden ensayarse en modelos animales *in vivo* para confirmar la deseada actividad profiláctica o terapéutica, así como para determinar la dosis terapéutica óptima, antes de su administración a seres humanos.

La cantidad de un antagonista concreto de Tek que será efectiva en un procedimiento de tratamiento concreto depende de la edad, tipo y gravedad de la afección que ha de tratarse, peso corporal, deseada duración del tratamiento, procedimiento de administración y otros parámetros. Las dosis efectivas se determinan por un médico u otro profesional médico cualificado. Las dosis efectivas típicas son de aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones preferidas la dosis es de aproximadamente 0,1-50 mg/kg; en algunas realizaciones preferidas la dosis es de aproximadamente 0,5-10 mg/kg. La dosis para administración local es típicamente inferior a la dosis para administración sistémica. En algunas realizaciones es suficiente una única administración; en algunas realizaciones el antagonista de Tek se administra como dosis múltiples a lo largo de uno o varios días.

Los antagonistas de Tek se administran típicamente en la forma de una composición farmacéutica que comprende uno o varios vehículos farmacológicamente aceptables. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen diluyentes, cargas, adyuvantes, excipientes y vehículos que son farmacéuticamente aceptables para la vía de administración y que pueden ser suspensiones acuosas u oleaginosas formuladas usando dispersantes, humectantes y agentes de suspensión apropiados.

# ES 2 262 518 T5

Los vehículos farmacéuticamente aceptables son generalmente estériles y están libres de agentes pirógenos y pueden incluir agua, aceites, disolventes, sales, azúcares y otros carbohidratos, emulsionantes, agentes tamponantes, agentes antimicrobianos y quelantes. El vehículo farmacéuticamente aceptable concreto y la relación entre el compuesto activo y el vehículo están determinados por la solubilidad y propiedades químicas de la composición, el modo de administración y la práctica farmacéutica estándar.

Los antagonistas de Tek se administran a un paciente en una forma adecuada a la indicación. Así por ejemplo, un antagonista de Tek, o una composición farmacéutica del mismo, puede administrarse por vía intravenosa, transdérmica, intradérmica, intraperitoneal, intramuscular, intranasal, epidural, oral, tópica, subcutánea, intracavidad, liberación continua a partir de implantes, rutas peristálticas o por cualquier otra técnica apropiada. Se prefiere la administración por vía parenteral.

El mamífero puede calentarse con uno o varios agentes quimioterapéuticos adicionales. El(los) agente(s) quimioterapéutico(s) adicional(es) puede(n) administrarse antes, simultáneamente, o después de la administración de los antagonistas de Tek. El uso de más de un agente quimioterapéutico es especialmente ventajoso cuando el mamífero que se está tratando tiene un tumor sólido. El mamífero puede tratarse con radiación. La radiación, que incluye bráquiterapia y teleterapia, puede administrarse antes, simultáneamente o después de la administración del(los) segundo(s) agente(s) quimioterapéutico(s) y/o del antagonista de Tek.

Cuando el mamífero que se está tratando tiene un tumor sólido, además de un antagonista de Tek, pueden administrarse uno o varios agentes quimioterapéuticos seleccionados del grupo que consta de agentes alquilantes, anti-metabolitos, alcaloides de la vinca y otros agentes quimioterapéuticos derivados de plantas, nitrosoureas, antibióticos antitumorales, enzimas antitumorales, inhibidores de topoisomerasa, análogos de platino, supresores adrenocorticales, hormonas, agonistas y antagonistas de hormonas, anticuerpos, agentes immunoterapéuticos, factores de células sanguíneas, agentes radioterapéuticos y modificadores de respuestas biológicas.

Además de un antagonista de Tek, pueden administrarse uno o varios agentes quimioterapéuticos seleccionados del grupo que consta de cisplatino, ciclofosfamida, mecloretamina, melfalán, bleomicina, carboplatino, fluorouracilo, 5-fluorodesoxiuridina, metotrexato, taxol, asparraginasa, vincristina y vinblastina, linfoquinas y citoquinas como interleucinas, interferones (incluyendo alfa, beta o delta) y TNF, clorambucilo, busulfano, carmustina, lomustina, semustina, estreptozocina, dacarbacin, citarabina, mercaptopurina, tioguanina, vindesina, etopósido, tenipósido, dacatinomicina, daunorrubicina, doxorrubicina, bleomicina, plicamicina, mitomicina, L-asparraginasa, hidroxiurea, metilhidracina, mitotano, tamoxifeno y fluoximesterona.

Además de un antagonista de Tek, pueden administrarse uno o varios agentes terapéuticos, incluyendo diversas formas solubles de los mismos, seleccionadas del grupo que consta del ligando de Flt3, ligando de CD40, interleucina-2, interleucina-12, ligando de 4-1BB, anticuerpos anti-4-1BB, antagonistas de TNF y antagonistas del receptor de TNF, TRAIL, antagonistas de VEGF, antagonistas del receptor de VEGF (incluyendo VEGF-R1 y VEGF-R2, conocidos también como Flt1 y Flk1 o KDR) y agonistas de CD148 (al que se hace referencia también como DEP-1, ECRTP y PTPRJ, véase Takahashi y col., J. Am. Soc. Nephrol. 10:2135-45, 1999).

Los antagonistas de Tek de la invención pueden usarse como un componente de, o en combinación con la “terapia metrónómica”, como la descrita por Browder y col. y Klement y col. (Cancer Research 60:1878, 2000; J. Clin. Invest. 105(8):R15, 2000; véase también Barinaga, Science 288:245, 2000).

Los polipéptidos de la presente invención pueden usarse como un tratamiento de primera línea, para el tratamiento de la enfermedad residual que sigue a la terapia primaria o como un complemento de otras terapias, incluyendo quimioterapia, cirugía, radiación y otros procedimientos terapéuticos conocidos en la materia.

## Ejemplos

Los ejemplos siguientes pretenden ilustrar realizaciones concretas sin limitar el alcance de la invención.

### Ejemplo 1

#### *Producción recombinante de polipéptidos de fusión Tek/Fc solubles*

La clonación molecular de un ADNc que codifica el receptor tirosinaquinasa (RTK) Tek (ork, Tie2) se describe en la patente de EE.UU. nº 5.447.860. El ADNc de Tek (depositado en la American Type Culture Collection, bajo los términos del Tratado de Budapest, el 28 de mayo de 1992, número de acceso ATCC 69003) codifica 1124 aminoácidos, incluyendo un péptido señal, un dominio extracelular N-terminal, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático C-terminal. Basado en el análisis de secuencia, se predice que el péptido señal comprende los restos 1-18, que el dominio extracelular N-terminal comprende los restos 19-745, que el dominio transmembrana comprende los restos 746-772 y que el dominio citoplasmático C-terminal se predice que comprende los restos 773-1124. El dominio extracelular incluye dos lazos similares a los de la inmunoglobulina (Ig), una región que contiene tres repeticiones de cisteína similares a las de EGF (entre los restos 211-340) y una región que contiene tres motivos de fibronectina del

# ES 2 262 518 T5

tipo III (FNIII) (entre los restos 440-733). El ADNc de Tek se usó para construir vectores de expresión recombinantes para la producción de diversos polipéptidos de fusión Tek/Fc.

Para construir un ácido nucleico codificante del dominio extracelular de longitud completa de Tek fusionado a Fc, se fusionó un ácido nucleico que codificaba los 745 aminoácidos N-terminales de Tek, incluyendo el líder de Tek (péptido señal) y el dominio extracelular, con un ácido nucleico que codificaba una porción Fc de 232 aminoácidos de la IgG1 humana. La secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión Tek/Fc codificado por esta construcción se muestra como SEC ID N.<sup>o</sup>:1. En SEC ID N.<sup>o</sup>:1, los restos 1-18 son el péptido señal pronosticado (que se predice que se escinde al ser secretado por la célula; el sitio de corte real se identificó por análisis de la secuencia N-terminal, véase a continuación), los restos 19-745 son el dominio extracelular de Tek y los restos 746-977 son la porción Fc. Tras la inserción en un vector de expresión de mamíferos, la expresión en una célula huésped de mamífero y la secreción por la misma, esta construcción produjo un polipéptido denominado Tek475/Fc. Basado en el sitio de corte pronosticado para el péptido señal, se predijo que la secuencia de aminoácidos de Tek475/Fc eran los restos 19-977 de SEC ID N.<sup>o</sup>:1.

Para construir un ácido nucleico codificante del dominio extracelular de longitud completa de Tek fusionado a Fc, se fusionó un ácido nucleico que codificaba los 742 aminoácidos N-terminales de Tek, incluyendo el líder de Tek (péptido señal) y el dominio extracelular, con un ácido nucleico que codificaba una porción Fc de 232 aminoácidos de la IgG1 humana. La secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión Tek/Fc codificado por esta construcción se muestra como SEC ID N.<sup>o</sup>:2. En SEC ID N.<sup>o</sup>:2, los restos 1-18 son el péptido señal pronosticado (que se predice que se escinde al ser secretado por la célula; el sitio de corte real se identificó por análisis de la secuencia N-terminal, véase a continuación), los restos 19-742 son el dominio extracelular de Tek y los restos 473-704 son la porción Fc. Tras la inserción en un vector de expresión de mamíferos, la expresión en una célula huésped de mamífero y la secreción por la misma, esta construcción produjo un polipéptido denominado Tek472/Fc. Basado en el sitio de corte pronosticado para el péptido señal, se predijo que la secuencia de aminoácidos de Tek472/Fc eran los restos 19-704 de SEC ID N.<sup>o</sup>:2.

Los ácidos nucleicos que codifican cada uno de los polipéptidos de fusión Tek/Fc se insertaron en vectores de expresión de mamíferos y cada vector se transfeció en células CHO. Después de la amplificación, las líneas de células CHO transfectadas de forma estable se cultivaron en condiciones que estimulaban la expresión y secreción de los polipéptidos de fusión recombinantes y los polipéptidos de fusión Tek/Fc se recuperaron y aislaron del medio de cultivo. El análisis de la secuencia N-terminal determinó que el polipéptido secretado denominado Tek745/Fc tenía un extremo N correspondiente con el resto 23 (alanina) de SEC ID N.<sup>o</sup>:1. El análisis de la secuencia N-terminal determinó que el polipéptido secretado denominado Tek472/Fc tenía un extremo N correspondiente con el resto 23 (alanina) de SEC ID N.<sup>o</sup>:2.

La actividad antiangiogénica de los polipéptidos de fusión Tek/Fc se demostró en los sistemas *in vitro* e *in vivo* descritos en los ejemplos 2-6.

## Ejemplo 2

### *Actividad de Tek/Fc en un ensayo de cierre de herida*

Para cuantificar la inhibición de la angiogénesis por Tek/Fc *in vitro* se usó un ensayo de migración celular en el plano del endotelio (cierre de herida). En este ensayo se mide la migración celular endotelial en términos de la velocidad de cierre de una herida circular en un cultivo celular monocapa. La velocidad de cierre de la herida es lineal y está regulada dinámicamente por agentes que estimulan e inhiben la angiogénesis *in vivo*.

Las células endoteliales microvasculares primarias de riñón humano, HRMEC, se aislaron, cultivaron y usaron en el tercer pase después de la descongelación, como se describe en Martin y col., *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 33:261, 1997. Se generaron lesiones circulares replicadas, "heridas" (600-800 micrómetros de diámetro), en monocapas confluentes de HRMEC usando una perforadora con punta de silicona. En el momento de la lesión, el medio (DMEM + BSA al 1%) se suplementó con 20 ng/ml de PMA (12-miristato-13-acetato de forbol), 10 µg/ml de Tek472/Fc, o combinaciones de 20 ng/ml de PMA y 0,001-10 µg/ml de Tek472/Fc. El área residual de la herida se midió en función del tiempo (0-12 horas) usando un microscopio y un software de análisis de imágenes (Bioquant, Nashville, TN). La velocidad de migración relativa se calculó para cada agente y combinación de agentes por regresión lineal del área residual de la herida en relación al tiempo. Los resultados se muestran en la figura 1. Tek472/Fc inhibió la migración endotelial inducida por PMA de forma proporcional a la dosis, reduciendo la velocidad de migración a los niveles sin estimulación a 10 µg/ml.

## Ejemplo 3

### *Actividad de Tek/Fc en un ensayo de bolsa corneal*

Para cuantificar la inhibición de la angiogénesis por Tek/Fc *in vivo* se usó un ensayo de bolsa corneal en ratón. En este ensayo, los agentes que han de ensayarse en cuanto a su actividad angiogénica o antiangiogénica se inmovilizan

## ES 2 262 518 T5

en una forma de liberación lenta en una pastilla de hydron, que se implanta en microbolsas creadas en el epitelio corneal de ratones anestesiados. La vascularización se mide como la apariencia, densidad y extensión del crecimiento de vasos desde el limbo corneal vascularizado hacia dentro de la córnea normalmente avascular.

5 Los gránulos de hydron, como se describe en Kenyon y col., Invest. Ophthalmol. & Visual Science 37:1625, 1996, contenían sucralfato con bFGF (90 ng/pastilla), bFGF e IgG (11 µg/pastilla, control), o bFGF y Tek472/Fc (12,8 µg). Las pastillas se implantaron quirúrgicamente en microbolsas en el estroma corneal creadas por microdissección de 1 mm en posición media con respecto al limbo corneal lateral de ratones C57BL machos de 6-8 semanas de edad. Despues de cinco días, en el pico de la respuesta neovascular a bFGF, se fotografiaron las córneas usando una lámpara de hendidura Zeiss, con un ángulo inicial de 35-50° desde el eje polar en el meridiano que contenía la pastilla. Las imágenes se digitalizaron y procesaron mediante filtros de colores sustractivos (Adobe Photoshop 4.0) para delinear los microvasos establecidos por su contenido de hemoglobina. Un software de análisis de imágenes (Bioquant, Nasville, TN) se usó para calcular la fracción de la imagen corneal que se había vascularizado, la densidad de vasos en el área vascularizada y la densidad de vasos dentro de toda la córnea. Los resultados se muestran en la figura 2. Tek472/Fc (50 pmol) inhibió la angiogénesis corneal inducida por bFGF (3 pmol), reduciendo la densidad vascular al 30% de la inducida únicamente por FGF.

### Ejemplo 4

#### 20 *Inhibición de la neovascularización por Tek/Fc en un modelo de trasplante murino*

La supervivencia de un tejido cardíaco transplantado heterotópicamente a partir de un ratón donante en la piel de la oreja de otro ratón genéticamente similar requiere la adecuada neovascularización del corazón transplantado y del tejido circundante, para estimular la supervivencia y la energía para la función del músculo cardíaco. Una vascularización inadecuada en el punto del trasplante causa una isquemia excesiva al corazón, daños en los tejidos y que el tejido no prendimiento del tejido. Los agentes antagonistas de las angiopoyetinas y de los factores específicos del endotelio implicados en la migración celular endotelial y en la formación de vasos pueden reducir la angiogénesis en el punto del trasplante, limitando así la función de injerto del tejido y, en último termino, el prendimiento del injerto en sí mismo.

30 Se llevaron a cabo los siguientes estudios, utilizando un modelo murino de isoinjerto cardíaco heterotópico, para demostrar los efectos antagonistas de Tek/Fc en la neovascularización. En todos los experimentos, receptores BALB/c hembra (=12 semanas de edad) recibieron injertos de corazón neonatal de ratones donantes de la misma cepa.

#### 35 A. *Tek/Fc a una dosis de 500 µg/día*

En cada uno de los tres experimentos se injertó el tejido del corazón donante en el pabellón auricular izquierdo del receptor en el día 0 y los ratones se dividieron en dos grupos. El grupo de control recibió IgG (Hu IgG), mientras que el otro grupo recibió Tek472/Fc humano, los dos por vía intraperitoneal a 500 µg por día. Todos los tratamientos comenzaron en el día 0 y se continuaron durante cinco días consecutivos. La funcionalidad de los injertos se determinó mediante monitorización de la actividad pulsátil visible en los días 7 y 14 después del injerto. La tabla 1 muestra los resultados acumulativos de los tres experimentos.

45 TABLA 1

#### *Injerto funcional en los días 7 y 14*

Total	Tratamiento	Día 7	Día 14
N = 8	Hu IgG	8/8 (100%)	8/8 (100%)
N = 11	Tek472/Fc	4/11 (36%)	9/11 (82%)

55 Los ocho ratones que recibieron Hu IgG presentaron injertos funcionales en los días 7 y 14, lo que indica un 100% de prendimiento del injerto. Los ratones tratados con Tek472/Fc inicialmente no demostraron una actividad funcional, indicativo de un prendimiento reducido del injerto, con injertos funcionales sólo en el 36% en el día 7. Pero en el día 14, diez días después del cese del tratamiento con Tek472/Fc, el 82% de los ratones presentaron injertos funcionales.

60 Los estudios histológicos en los corazones transplantados de los ratones que recibieron Tek/Fc mostraron un aumento del edema en el punto del trasplante, indicativo de pérdidas vasculares, y una tinción reducida de la vasculatura de los tejidos del huésped y del donante (factor VIII) en comparación con la observada en los corazones transplantados de los ratones que recibieron la proteína de control IgG.

65 Este experimento mostró que el tratamiento con Tek472/Fc compromete gravemente la función del isoinjerto cardíaco y evita el prendimiento del injerto de tejido en el 64% de los ratones en el día 7, después de una terapia de cinco días.

# ES 2 262 518 T5

## B. Titulación de la dosis de Tek/Fc

En el modelo de isoinjerto cardíaco descrito anteriormente se ensayaron tres dosis diferentes de Tek/Fc. Cada grupo de ensayo contenía cuatro ratones BALB/c hembra. El grupo de control recibió IgG humana (Hu IgG) por vía intraperitoneal, a 500 µg por día durante cinco días consecutivos. Los grupos Tek/Fc recibieron Tek472/Fc humano, por vía intraperitoneal, a 90, 250 ó 500 µg por día durante cinco días consecutivos. La funcionalidad de los injertos se determinó mediante monitorización de la actividad pulsátil visible en los días 7, 11, 14, 17 y 21 después del injerto. Los resultados se muestran en la tabla 2.

10

TABLA 2

*Injerto funcional después de una titulación de la dosis de Tek*

15

Tratamiento	Día 7	Día 11	Día 14	Día 17	Día 21
Hu IgG 500 µg	100*	100	100	100	100
Tek472/Fc 90 µg	75	00	100	100	100
Tek472/Fc 250 µg	25	75	75	100	100
Tek472/Fc 500 µg	25	75	75	75	75

20

25

30

\* todos los resultados se indican como el porcentaje de ratones con injertos de corazón pulsátiles

35

40

Una magnitud similar de disrupción del prendimiento del isoinjerto cardíaco se observó con las dosis tanto de 250 µg como 500 µg de Tek/Fc, en comparación con el control Hu IgG, en que no se observó ningún efecto en el prendimiento del injerto. Con la dosis de 90 µg se observó una pequeña, aunque significativamente poco importante, reducción del prendimiento del injerto.

## Ejemplo 5

45

### Tratamiento de tumores con Tek472/Fc

50

Tek472/Fc se administró sólo o en combinación con Flt3L, para tratar a ratones con tumores del fibrosarcoma 87 o del fibrosarcoma B10.2. Los tumores B10.2 y 87 son del fenotipo progresivo, es decir, crecen progresivamente en los ratones normales. El fibrosarcoma B10.2 se indujo por implantación subcutánea de una pastilla de parafina con 5 mg de metilcolantreno en ratones C57BL (Lynch y Miller, Eur. J. Immunol. 21:1403, 1991). El fibrosarcoma 87 es una variante progresiva de un tumor inducido por la exposición crónica de ratones C3H/HeN a radiación UVB. Para inocular tumores en ratones para estos experimentos, se inyectaron (día 0)  $5 \times 10^5$  células por vía intradérmica en el abdomen (véase también Borges y col., J. Immunol. 163:1289, 1999).

55

60

Los tumores del fibrosarcoma 87 en los ratones C3H/HeN se trajeron con MSA (albúmina de suero murino, control), Tek/Fc (312 µg/día, en los días 4-19 después de la inyección de las células tumorales), o una combinación de Tek/Fc y Flt3L (Tek/Fc a 312 µg/día, días 4-19; Flt3L a 10 µg/día, en los días 1-19 después de la inyección de las células tumorales). Cada grupo de tratamiento constó de diez ratones. La frecuencia de tumores y el tamaño de los tumores se midieron semanalmente durante cinco semanas. Los resultados se muestran en la figura 3. Los ratones tratados con la combinación de Tek/Fc y Flt3L mostraron las menores velocidades de crecimiento de los tumores. En la semana 6, un animal más del grupo Tek/Fc más Flt3L rechazó el tumor, reduciendo la frecuencia de tumores al 68%. Basado en los resultados de este experimento, se usó la combinación de Tek/Fc y Flt3L para tratar tumores preexistentes del fibrosarcoma B10.2.

65

Los tumores del fibrosarcoma B10.2 en los ratones C57BL/10 se trajeron con MSA (control), Tek/Fc (625 µg/día, en los días 7-32 después de la inyección de las células tumorales), Flt3L (10 µg/día, en los días 7-26 después de la inyección de las células tumorales), o una combinación de Tek/Fc y Flt3L (Tek/Fc a 312,5 µg/día o 625 µg/día, días 7-32; Flt3L a 10 µg/día, en los días 7-26 después de la inyección de las células tumorales). Cada grupo de tratamiento

## ES 2 262 518 T5

constó de diez ratones. La frecuencia de tumores y el tamaño de los tumores se midieron semanalmente durante seis semanas. Los resultados se muestran en la figura 4. Los ratones tratados con las dos combinaciones de Tek/Fc y Flt3L mostraron velocidades reducidas de crecimiento de los tumores; los ratones tratados con 625 µg/día de Tek/Fc en combinación con Flt3L mostraron la menor velocidad de crecimiento de los tumores.

5

### Ejemplo 6

#### *Unión de los polipéptidos de fusión Tek/Fc a angiopoyetina*

10

Tanto Tek745/Fc como Tek472/Fc se examinaron en cuanto a su capacidad para unirse al ligando humano de Tek, angiopoyetina-2 (Ang2), usando un ensayo de unión a fase sólida en placa basado en fluorescencia con resolución temporal. La comparación de la unión a la Ang2 humana de las dos formas diferentes de Tek/Fc soluble reveló que la unión de Tek472/Fc a Ang2 es significativamente mejor (21 veces mejor) que la de Tek745/Fc.

15

Se incubaron pocillos de baja fluorescencia de placas de microtitulación de tiras de 8x12 (Perkin-Wallac, Akron, Ohio) con la Ang2 humana (R&D Systems) a 500 ng/ml (100 µl) durante la noche a 2-8°C. Los pocillos se bloquearon entonces por la adición de 100 µl de una disolución de BSA/PBS al 1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Despues lavar 4 veces con PBS-T (PBS-Tween 20 al 0,05%), las muestras que contenían Tek745/Fc, Tek472/Fc o TNFR/Fc (control/Fc) se titularon en el diluyente (BSA/PBS al 1%), por duplicado, comenzando con 30 µg/ml con 3 diluciones diluciones seriadas. Las muestras se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave para permitir la unión, y el material no unido se retiró lavando 4 veces con PBS-T. El Tek/Fc unido se detectó añadiendo a los pocillos un conjugado de anti-IgG humana de cabra con europio (Perkin-Wallac), diluido a 100 ng/ml en tampón de ensayo, e incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente. El conjugado de anti-IgG humana de cabra con europio no unido se retiró lavando 4 veces con PBS-T. Después del lavado se añadieron 150 µl de disolución de potenciación (Perkin Wallac) a cada pocillo y la placa se dejó incubar a temperatura ambiente durante un mínimo de 5 minutos. La unión se determinó mediante lectura de la fluorescencia emitida por cada pocillo en un contador Victor II Multilabel equipado con un software y dispositivos de excitación/emisión de luz para medir fluorescencia derivada de europio. Los resultados, expresados como cuentas de fluorescencia, se muestran en la figura 5.

20

El control TNFR/Fc no mostró una unión detectable a Ang2 (sobre la observada para el nivel de fondo). Tanto Tek472/Fc como Tek745/Fc se unieron a la Ang2 humana de manera dependiente de la concentración, pero Tek472/Fc presentó una mayor afinidad de unión. La unión de Tek472/Fc fue más de 20 veces mejor que la de Tek745/Fc, basado en la concentración de masas. Se requirieron concentraciones mucho más altas de Tek745/Fc para alcanzar el mismo nivel de unión observado con menores concentraciones de Tek472/Fc. El BC40K (la concentración de Tek/Fc requerida para alcanzar 40000 cuentas de fluorescencia de unión a huANG-2) para Tek745/Fc fue 20596 ng/ml, en comparación con el BC40K para Tek472/Fc que fue 994 ng/ml.

25

### Ejemplo 7

#### *Anticuerpos monoclonales bloqueadores específicos contra Tek*

30

##### A. Anticuerpos contra Tek472/Fc

35

Los anticuerpos contra la “fusión del dominio extracelular de Tie2 recombinante con Fc” han sido descritos por Holmes y col., documento WO 00/18437. En contraste, los presentes inventores prepararon anticuerpos contra el polipéptido de fusión del dominio extracelular de Tek, Tek472/Fc. Como se muestra en el ejemplo 6, Tek472/Fc se une al ligando de Tek con mayor afinidad que Tek745/Fc.

40

Se inmunizaron ratones BALB/c con el polipéptido de fusión Tek/Fc descrito en el ejemplo 1, Tek472/Fc. Se recolectaron células del bazo y se usaron para preparar hibridomas usando procedimientos estándar. Los subrenadantes de los hibridomas se criaron, mediante ELISA, en función de la capacidad para unirse a (a) Tek472/Fc y (b) células CV1 que expresaban Tek humano. Los hibridomas positivos se clonaron dos veces para asegurar su monoclonalidad, después se determinó el isotipo y se volvieron a ensayar para determinar su reactividad frente a Tek.

45

Se eligieron tres anticuerpos para los experimentos posteriores: M530 (isotipo IgG2b), M531 (isotipo IgG2b) y M532 (isotipo IgG1). M530 y M531 parecen reconocer el mismo epítopo y M532 reconoce un segundo (diferente) epítopo. Por tanto, M530 y M531 se usaron como pareja de anticuerpos (por ejemplo para captura y detección) en varios inmunoensayos. Se demostró (por ensayos de inmunoprecipitación y de unión a fase sólida en placa) que M530 se une a Tek745/Fc, Tek472/Fc y al Tek que se produce de forma natural, como se expresa en la superficie de células endoteliales humanas. El anticuerpo M530 se caracterizó adicionalmente en los estudios de unión y de cartografía de epítopos descritos en el ejemplo 8, a continuación.

50

##### B. Anticuerpos adicionales contra Tek

Una serie de anticuerpos de trabajo supuestamente específicos contra células endoteliales, que aún no se han agrupado, se obtuvo del Human Leukocyte Differentiation Antigens (HLDA) Workshop. Algunos de los anticuerpos

# ES 2 262 518 T5

se generaron mediante la inmunización de ratones con células endoteliales humanas. Se sabía que un anticuerpo de la serie reacciona con Tek humano. Estos anticuerpos se caracterizaron adicionalmente en los estudios de unión y de cartografía de epítopos descritos en el ejemplo 8, a continuación.

5

## Ejemplo 8

### *Unión de anticuerpos contra Tek a Tek y a células endoteliales microvasculares humanas*

#### 10 A. *Unión de anticuerpos al dominio extracelular de longitud completa de Tek y a células endoteliales*

En un ensayo de unión a fase sólida en placa (fluorescencia con resolución temporal, como se describe en el ejemplo 6), el anticuerpo monoclonal contra Tek humano, M530 descrito en el ejemplo 7A y ocho anticuerpos monoclonales descritos en el ejemplo 7B (anticuerpos específicos contra células endoteliales numerados WS 70098, 70099, 15 70100, 70101, 70104, 70108, 70112 y el anticuerpo 70637 supuestamente específico contra Tek) se unieron específicamente al polipéptido de fusión del Tek extracelular de longitud completa, Tek745/Fc. Un mAb IgG1 como control negativo (MOPC21) no mostró una unión a Tek745/Fc por encima del nivel de fondo. Otros dos anticuerpos de trabajo específicos contra células epiteliales (WS 70110 y 70115) no mostraron una unión detectable a Tek745/Fc.

20 Usando citometría de flujo, se demostró que los anticuerpos monoclonales contra Tek humano M530, M531 y M532 descritos en el ejemplo 7A y ocho anticuerpos monoclonales descritos en el ejemplo 7B (los anticuerpos específicos contra células endoteliales numerados 70098, 70099, 70100, 70101, 70104, 70108, 70112 y el anticuerpo específico contra Tek 70637) se unen al Tek que se produce de forma natural, como se expresa en células endoteliales humanas (tanto células endoteliales microvasculares humanas de piel adulta como HUVEC).

25

#### B. *Unión de anticuerpos a un dominio extracelular de Tek que carece de los motivos FN3*

El anticuerpo monoclonal M530 descrito en el ejemplo 7A y siete anticuerpos monoclonales descritos en el ejemplo 7B (los anticuerpos específicos contra células epiteliales numerados 70098, 70099, 70100, 70101, 70104, 70108 y 70112) se unieron específicamente al polipéptido de fusión del Tek extracelular delecionado Tek472/Fc. Los anticuerpos de trabajo 70637 (que se unió a Tek745/Fc), 70110 y 70115 no se unieron a Tek472/Fc.

#### 35 C. *Inhibición competitiva de la unión de anticuerpos por ligandos de Tek*

Angiopoyetina-1 (Ang1, Davis y col., Cell 87:1161, 1996) y angiopoyetina-2 (Ang2, Maisonpierre y col., Science 277:55, 1997) son dos ligandos de Tek estrechamente relacionados. Las dos Ang1 y Ang2 se unen al Tek humano con afinidad similar. Se ha demostrado que la adición de un exceso molar de Ang2 a cultivos de células endoteliales en presencia de Ang1 inhibe la activación de Tek inducida por Ang1 en las células epiteliales debido a la competencia con la unión de Ang1 a las células endoteliales (Maisonpierre y col., Science 277:55, 1997). Una preparación de angiopoyetina-2 humana recombinante se obtuvo de R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN). Según el fabricante, la preparación de angiopoyetina-2 migra como una proteína de 66 kDa en electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS, tanto en condiciones reductoras como no reductoras. Basado en la secuenciación de los aminoácidos de extremo N, la preparación contiene dos péptidos: un polipéptido principal (75% del total) cuyo extremo N es Asp68 y un polipéptido secundario (25% del total), cuyo extremo N es Tyr19.

La capacidad de esta preparación de Ang2 de inhibir competitivamente la unión de los anticuerpos contra Tek al Tek expresado en células endoteliales microvasculares de piel humana, se ensayó mediante citometría de flujo.

50

Cada mAb se añadió a 500000 células HMVEC-d a 5 µg/ml en tubos Falcon de 12x75 mm, por duplicado y se dejaron incubar durante 15 minutos a 4°C en medio de unión. Se añadió a una de las réplicas Ang2 humana a 10 µg/ml (un exceso molar de 5 veces) durante 30 minutos más. Las células con el mAb contra Tek unido se lavaron entonces en 20 volúmenes de un tampón de lavado que contenía PBS. Después de la etapa de lavado, el mAb de ratón unido se detectó mediante la adición a las células de F(ab'2) de oveja anti-IgG de ratón conjugado con PE fluorescente, seguido de una incubación de 30 minutos a 4°C y un lavado adicional en 20 volúmenes. La unión del mAb contra Tek se midió por análisis de citometría de flujo en un citómetro FACSCAN de láser único (Becton Dickinson, Sunnyvale CA). El porcentaje de inhibición de la unión de anticuerpos se calculó usando la fórmula:

60

$$\text{IFM (no Ang2)} - \text{IFM (+Ang2)} / \text{IFM (no Ang2)} \times 100.$$

65

## ES 2 262 518 T5

Los resultados se muestran en la tabla 3.

TABLA 3

*Inhibición de la unión de anticuerpos contra Tek por Ang2*

Anticuerpo monoclonal 5 µg/ml	Porcentaje de inhibición de la unión de anticuerpos por Ang2
control negativo (MOPC-21)	0
control de unión ( $\alpha\text{v}\beta 3$ )	6,4
Nº M530	41,6
Nº 70098	45,9
Nº 70099	44,4
Nº 70100	0
Nº 70101	38,7
Nº 70104	6,3
Nº 70108	50,8
Nº 70112	47,6
Nº 70637	0

Estos resultados, la inhibición de la unión de los anticuerpos contra Tek por Ang2, sugieren que los anticuerpos M530, 70098, 70099, 70101, 70108 y 70112 se unen al, o cerca del sitio de unión del ligando de Tek. Los anticuerpos monoclonales M530, WS 70099 y 70112 también fueron capaces de inhibir la unión de Ang2 (100 ng/ml) al Tek472/Fc humano recombinante en más del 50%, para los anticuerpos monoclonales M530 y 70112 a concentraciones de 10 µg/ml o superiores y para el anticuerpo monoclonal 70099 a concentraciones de 3 µg/ml o superiores.

En combinación, los resultados de unión descritos en este ejemplo definen al menos tres epítopos para anticuerpos en el dominio extracelular de Tek, e ilustran la utilidad de la preparación de anticuerpos mediante el uso como inmunógeno/diana de un fragmento del dominio extracelular de Tek que carece de toda o parte de la región que contiene los motivos de fibronectina del tipo III (FNIII).

45

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

- 5        1. Un polipéptido que comprende el dominio extracelular de Tek, mostrado como los restos 1945 de SEC ID N.º:1, en el que el polipéptido carece de los restos 473-745 de SEC ID N.º:1 que contienen motivos de fibronectina del tipo III (FNIII) y en el que el polipéptido tiene una mayor afinidad de unión a angiopoyetina-1 o angiopoyetina-2 o angiopoyetina-4 que un polipéptido que comprende el dominio extracelular de longitud completa de Tek.
- 10      2. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que el dominio extracelular de Tek se selecciona del grupo constituido por:
- 15                  (a) los restos 23-472 de SEC ID N.º:2;
- 15                  (b) variantes que son idénticas a (a) al menos en el 95%;
- 15                  (c) variantes que son idénticas a (a) al menos en el 98%;
- 20                  (d) variantes que son idénticas a (a) al menos en el 99%; y
- 20                  (e) los restos 19-472 de SEC ID N.º:2.
3. El polipéptido de la reivindicación 2 constituido por los restos 19-704 ó 23-704 de la SEC ID N.º:2.
- 25      4. Un ácido nucleico que codifica un polipéptido según la reivindicación 1, 2 ó 3.
- 25      5. El ácido nucleico de la reivindicación 4, que codifica además una secuencia de péptido señal.
- 30      6. El ácido nucleico de la reivindicación 5 que codifica la secuencia SEC ID N.º:2.
- 30      7. Un polipéptido producido por un proceso que comprende la expresión de un ácido nucleico según una de las reivindicaciones 4, 5 ó 6 en una célula huésped recombinante en condiciones que permiten la expresión del polipéptido.
- 35      8. El polipéptido de la reivindicación 7, en que el proceso comprende la expresión de un ácido nucleico según la reivindicación 5 para la reivindicación 6 y además comprende la recogida del polipéptido secretado por la célula huésped.
- 35      9. Un multímero de Tek soluble que comprende una pluralidad de polipéptidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 7 u 8.
- 40      10. El multímero de Tek soluble de la reivindicación 9 en el que el multímero es un dímero o trímero.
- 40      11. El multímero de Tek soluble de la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en el que el multímero comprende un polipéptido Fc, una cremallera de leucina o un ligador peptídico.
- 45      12. El uso de un polipéptido según una de las reivindicaciones 1, 2, 3, 7 u 8 en la fabricación de un medicamento para su uso en la inhibición de la angiogénesis en un mamífero.
- 45      13. El uso de un multímero de Tek soluble según una cualquiera de las reivindicaciones 9-11 en la fabricación de un medicamento para su uso en la inhibición de la angiogénesis en un mamífero.
- 50      14. El uso de la reivindicación 13, en que el Tek es un Tek humano.
- 50      15. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 12-14, en el que el medicamento comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 55      16. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 12-15, en el que el medicamento se usa en el tratamiento de una enfermedad o afección mediada por angiogénesis.
- 55      17. El uso de la reivindicación 16, en el que la enfermedad o afección se **caracteriza** por una neovascularización ocular.
- 60      18. El uso de la reivindicación 16, en el que la enfermedad o afección es un tumor sólido.
- 60      19. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 12-18, en el que el medicamento comprende además un segundo agente quimioterapéutico.
- 65      20. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 12-19, en el que el medicamento es apropiado para su uso en combinación con radiación.

# ES 2 262 518 T5

21. El uso de la reivindicación 19 o la reivindicación 20, en el que el segundo agente quimioterapéutico se selecciona del grupo constituido por agentes alquilantes, antimetabolitos, alcaloides de la vinca y otros agentes quimioterapéuticos derivados de plantas, nitrosoureas, antibióticos antitumorales, enzimas antitumorales, inhibidores de topoisomerasa, análogos de platino, supresores adrenocorticales, hormonas, agonistas de hormonas, antagonistas de 5 hormonas, anticuerpos, agentes inmunoterapéuticos, factores de células sanguíneas, agentes radioterapéuticos y modificadores de respuestas biológicas.

22. El uso de la reivindicación 19 o la reivindicación 20, en el que el segundo agente terapéutico se selecciona del grupo constituido por cisplatino, ciclofosfamida, mecloretamina, melfalán, bleomicina, carboplatino, fluorouracilo, 10 5-fluorodesoxiuridina, metotrexato, taxol, asparraginasa, vincristina y vinblastina, linfocinas y citocinas como interleucinas, interferones (incluyendo alfa, beta o delta) y TNF, clorambucilo, busulfano, carmustina, lomustina, semustina, estreptozocina, dacarbacina, citarabina, mercaptopurina, tioguanina, vindesina, etopósido, tenipósido, dactinomicina, daunorrubicina, doxorrubicina, bleomicina, plicamicina, mitomicina, L-asparraginasa, hidroxiurea, metilhidracina, 15 mitotano, tamoxifeno y fluoximesterona.

23. El uso de la reivindicación 19 o la reivindicación 20, en el que el segundo agente quimioterapéutico se selecciona del grupo constituido por ligando de Flt3, ligando de CD40, interleucina-2, interleucina-12, ligando de 4-1BB, 15 20 anticuerpos anti-4-1BB, antagonistas de TNF y antagonistas del receptor de TNF, TRAIL, agonistas de CD148, antagonistas de VEGF, y antagonistas del receptor de VEGF.

24. El uso de un antagonista de Tek seleccionado del grupo constituido por (a) un polipéptido según una de las reivindicaciones 1, 2, 3, 7 u 8; y (b) un multímero de Tek soluble según una de las reivindicaciones 9-11; en la fabricación de un medicamento para su uso en la inhibición de la unión a Tek de un ligando de Tek en un mamífero.

25. Un procedimiento para determinar si un anticuerpo que se une a un polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 7 u 8 es un antagonista de Tek, que comprende determinar si el anticuerpo es un antagonista de Tek por su capacidad para inhibir la unión del ligando Tek al polipéptido de los restos 23-704 de la SEQ ID No: 2.

30

35

40

45

50

55

60

65

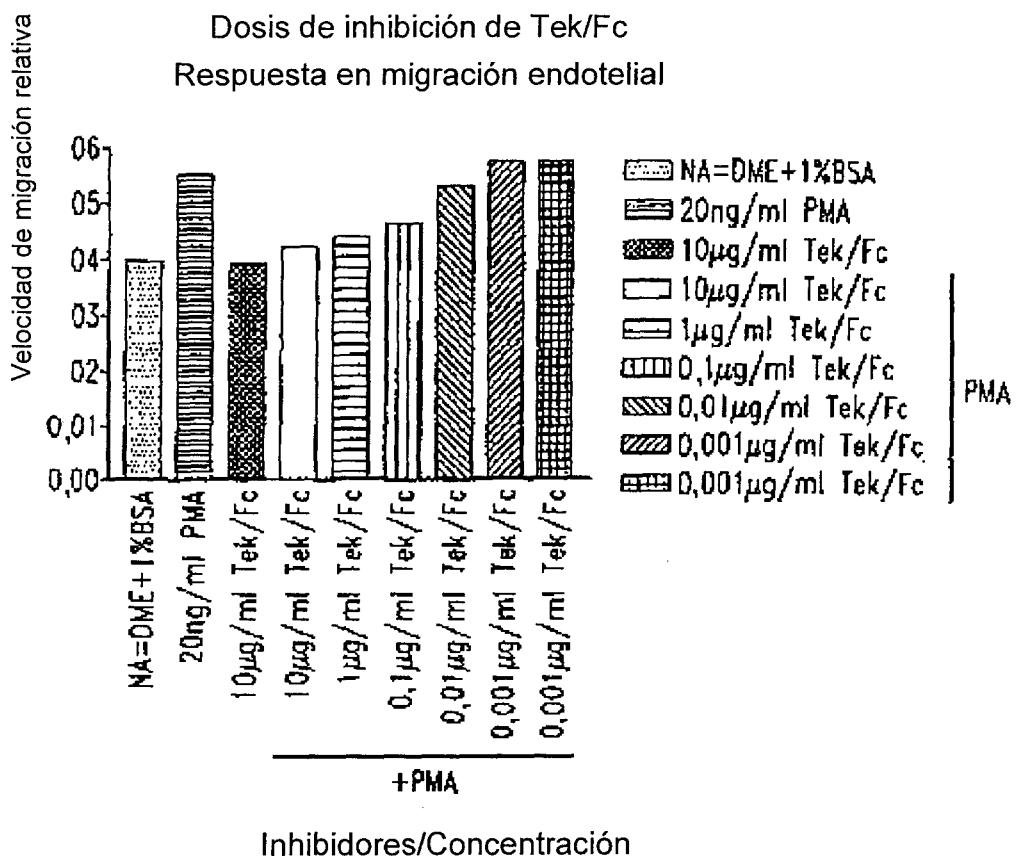


Fig. 1

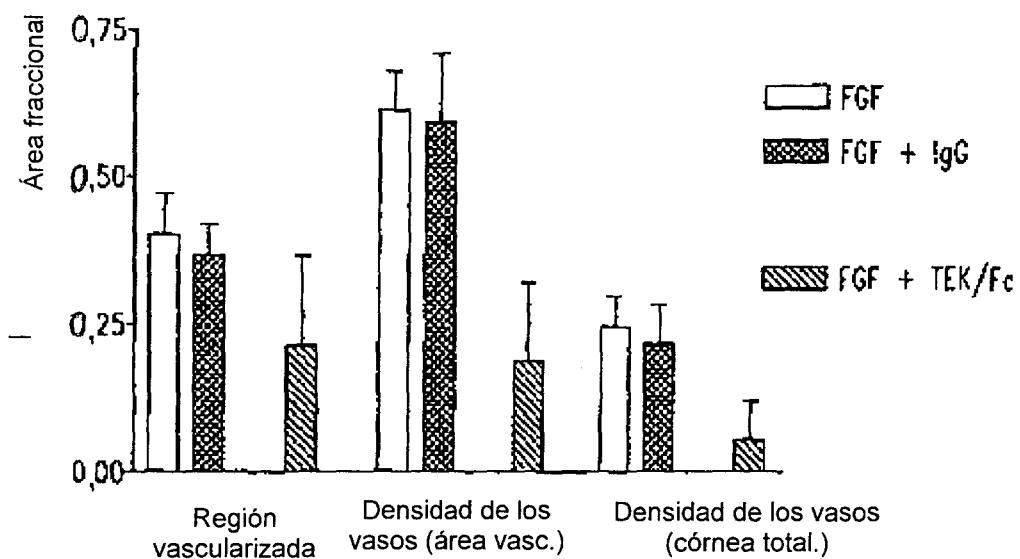
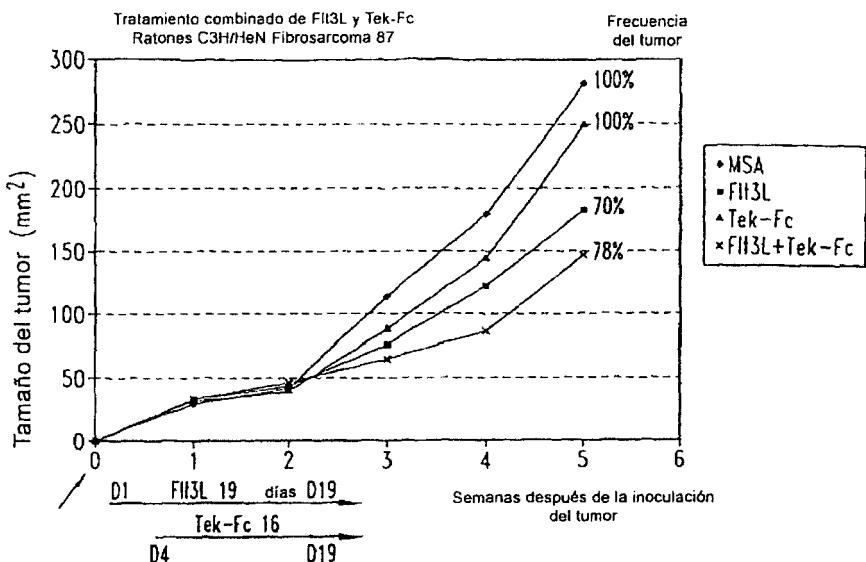
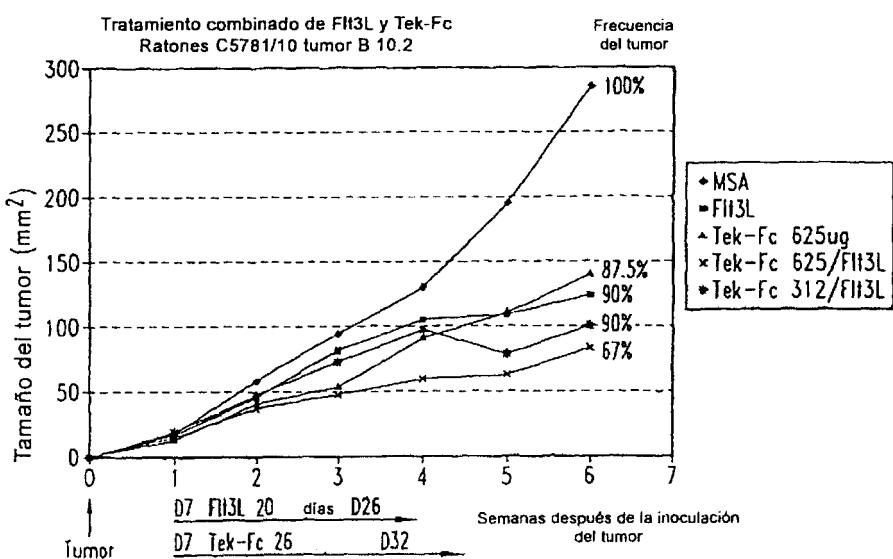


Fig. 2

## ES 2 262 518 T5

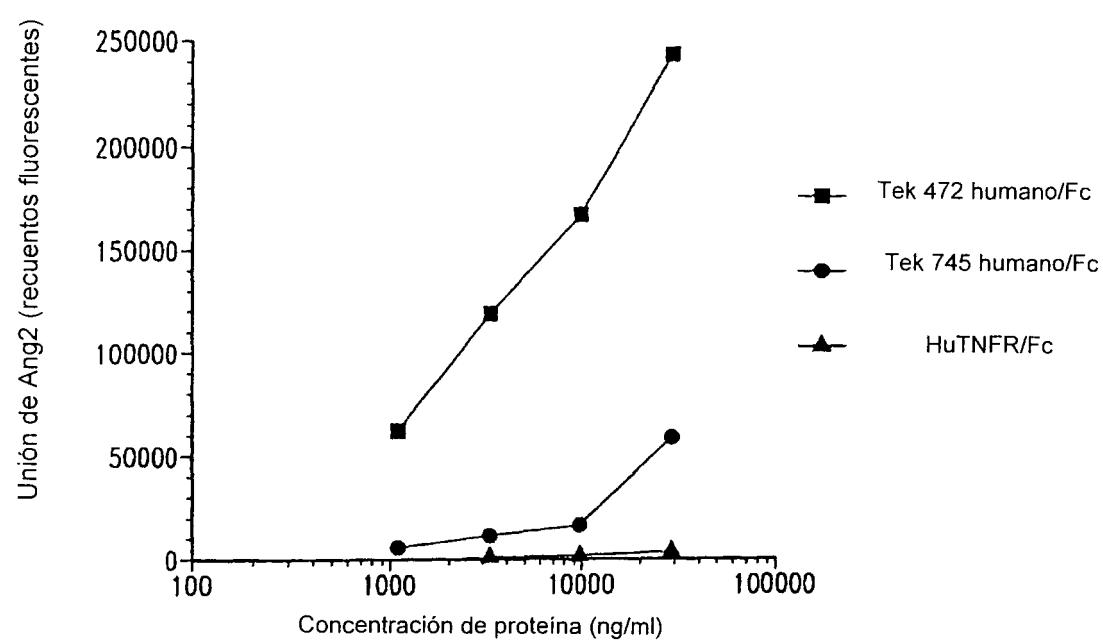


*Fig. 3*



*Fig. 4*

## ES 2 262 518 T5



*Fig. 5*

ES 2 262 518 T5

## **LISTA DE SECUENCIAS**

# ES 2 262 518 T5

	Arg Arg Cys Glu Ala Gln Lys Trp Gly Pro Glu Cys Asn His Leu Cys			
	210	215	220	
5	Thr Ala Cys Met Asn Asn Gly Val Cys His Glu Asp Thr Gly Glu Cys			
	225	230	235	240
	Ile Cys Pro Pro Gly Phe Met Gly Arg Thr Cys Glu Lys Ala Cys Glu			
	245	250	255	
10	Leu His Thr Phe Gly Arg Thr Cys Lys Glu Arg Cys Ser Gly Gln Glu			
	260	265	270	
	Gly Cys Lys Ser Tyr Val Phe Cys Leu Pro Asp Pro Tyr Gly Cys Ser			
	275	280	285	
15	Cys Ala Thr Gly Trp Lys Gly Leu Gln Cys Asn Glu Ala Cys His Pro			
	290	295	300	
20	Gly Phe Tyr Gly Pro Asp Cys Lys Leu Arg Cys Ser Cys Asn Asn Gly			
	305	310	315	320
	Glu Met Cys Asp Arg Phe Gln Gly Cys Leu Cys Ser Pro Gly Trp Gln			
	325	330	335	
25	Gly Leu Gln Cys Glu Arg Glu Gly Ile Pro Arg Met Thr Pro Lys Ile			
	340	345	350	
	Val Asp Leu Pro Asp His Ile Glu Val Asn Ser Gly Lys Phe Asn Pro			
	355	360	365	
30	Ile Cys Lys Ala Ser Gly Trp Pro Leu Pro Thr Asn Glu Glu Met Thr			
	370	375	380	
	Leu Val Lys Pro Asp Gly Thr Val Leu His Pro Lys Asp Phe Asn His			
	385	390	395	400
35	Thr Asp His Phe Ser Val Ala Ile Phe Thr Ile His Arg Ile Leu Pro			
	405	410	415	
	Pro Asp Ser Gly Val Trp Val Cys Ser Val Asn Thr Val Ala Gly Met			
	420	425	430	
40	Val Glu Lys Pro Phe Asn Ile Ser Val Lys Val Leu Pro Lys Pro Leu			
	435	440	445	
	Asn Ala Pro Asn Val Ile Asp Thr Gly His Asn Phe Ala Val Ile Asn			
	450	455	460	
	Ile Ser Ser Glu Pro Tyr Phe Gly Asp Gly Pro Ile Lys Ser Lys Lys			
	465	470	475	480
50	Leu Leu Tyr Lys Pro Val Asn His Tyr Glu Ala Trp Gln His Ile Gln			
	485	490	495	
	Val Thr Asn Glu Ile Val Thr Leu Asn Tyr Leu Glu Pro Arg Thr Glu			
	500	505	510	
55	Tyr Glu Leu Cys Val Gln Leu Val Arg Arg Gly Glu Gly Gly Glu Gly			
	515	520	525	
	His Pro Gly Pro Val Arg Arg Phe Thr Thr Ala Ser Ile Gly Leu Pro			
	530	535	540	
60	Pro Pro Arg Gly Leu Asn Leu Leu Pro Lys Ser Gln Thr Thr Leu Asn			
	545	550	555	560

# ES 2 262 518 T5

	Leu Thr Trp Gln Pro Ile Phe Pro Ser Ser Glu Asp Asp Phe Tyr Val			
	565	570	575	
5	Glu Val Glu Arg Arg Ser Val Gln Lys Ser Asp Gln Gln Asn Ile Lys			
	580	585	590	
	Val Pro Gly Asn Leu Thr Ser Val Leu Leu Asn Asn Leu His Pro Arg			
10	595	600	605	
	Glu Gln Tyr Val Val Arg Ala Arg Val Asn Thr Lys Ala Gln Gly Glu			
	610	615	620	
	Trp Ser Glu Asp Leu Thr Ala Trp Thr Leu Ser Asp Ile Leu Pro Pro			
15	625	630	635	640
	Gln Pro Glu Asn Ile Lys Ile Ser Asn Ile Thr His Ser Ser Ala Val			
	645	650	655	
20	Ile Ser Trp Thr Ile Leu Asp Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Ile Thr Ile			
	660	665	670	
	Arg Tyr Lys Val Gln Gly Lys Asn Glu Asp Gln His Val Asp Val Lys			
	675	680	685	
25	Ile Lys Asn Ala Thr Ile Ile Gln Tyr Gln Leu Lys Gly Leu Glu Pro			
	690	695	700	
	Glu Thr Ala Tyr Gln Val Asp Ile Phe Ala Glu Asn Asn Ile Gly Ser			
	705	710	715	720
30	Ser Asn Pro Ala Phe Ser His Glu Leu Val Thr Leu Pro Glu Ser Gln			
	725	730	735	
	Ala Pro Ala Asp Leu Gly Gly Lys Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys			
	740	745	750	
35	Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro			
	755	760	765	
	Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Asp Thr Leu Met Ile Ser			
40	770	775	780	
	Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp			
	785	790	795	800
	Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn			
45	805	810	815	
	Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val			
	820	825	830	
50	Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu			
	835	840	845	
	Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys			
	850	855	860	
55	Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr			
	865	870	875	880
	Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr			
60	885	890	895	
	Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu			
	900	905	910	

# ES 2 262 518 T5

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
 915 920 925

5 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
 930 935 940

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
 945 950 955 960

10 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 965 970 975

Lys

15 <210> 2

<211> 704

<212>PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

25 Met Asp Ser Leu Ala Ser Leu Val Leu Cys Gly Val Ser Leu Leu Leu  
 1 5 10 15

Ser Gly Thr Val Glu Gly Ala Met Asp Leu Ile Leu Ile Asn Ser Leu  
 20 25 30

30 Pro Leu Val Ser Asp Ala Glu Thr Ser Leu Thr Cys Ile Ala Ser Gly  
 35 40 45

Trp Arg Pro His Glu Pro Ile Thr Ile Gly Arg Asp Phe Glu Ala Leu  
 50 55 60

35 Met Asn Gln His Gln Asp Pro Leu Glu Val Thr Gln Asp Val Thr Arg  
 65 70 75 80

Glu Trp Ala Lys Lys Val Val Trp Lys Arg Glu Lys Ala Ser Lys Ile  
 85 90 95

40 Asn Gly Ala Tyr Phe Cys Glu Gly Arg Val Arg Gly Glu Ala Ile Arg  
 100 105 110

Ile Arg Thr Met Lys Met Arg Gln Gln Ala Ser Phe Leu Pro Ala Thr  
 115 120 125

45 Leu Thr Met Thr Val Asp Lys Gly Asp Asn Val Asn Ile Ser Phe Lys  
 130 135 140

50 Lys Val Leu Ile Lys Glu Glu Asp Ala Val Ile Tyr Lys Asn Gly Ser  
 145 150 155 160

Phe Ile His Ser Val Pro Arg His Glu Val Pro Asp Ile Leu Glu Val  
 165 170 175

55 His Leu Pro His Ala Gln Pro Gln Asp Ala Gly Val Tyr Ser Ala Arg  
 180 185 190

Tyr Ile Gly Gly Asn Leu Phe Thr Ser Ala Phe Thr Arg Leu Ile Val  
 195 200 205

60 Arg Arg Cys Glu Ala Gln Lys Trp Gly Pro Glu Cys Asn His Leu Cys  
 210 215 220

Thr Ala Cys Met Asn Asn Gly Val Cys His Glu Asp Thr Gly Glu Cys  
 225 230 235 240

65

# ES 2 262 518 T5

	Ile Cys Pro Pro Gly Phe Met Gly Arg Thr Cys Glu Lys Ala Cys Glu			
	245	250	255	
5	Leu His Thr Phe Gly Arg Thr Cys Lys Glu Arg Cys Ser Gly Gln Glu			
	260	265	270	
	Gly Cys Lys Ser Tyr Val Phe Cys Leu Pro Asp Pro Tyr Gly Cys Ser			
	275	280	285	
10	Cys Ala Thr Gly Trp Lys Gly Leu Gln Cys Asn Glu Ala Cys His Pro			
	290	295	300	
	Gly Phe Tyr Gly Pro Asp Cys Lys Leu Arg Cys Ser Cys Asn Asn Gly			
	305	310	315	320
15	Glu Met Cys Asp Arg Phe Gln Gly Cys Leu Cys Ser Pro Gly Trp Gln			
	325	330	335	
20	Gly Leu Gln Cys Glu Arg Glu Gly Ile Pro Arg Met Thr Pro Lys Ile			
	340	345	350	
	Val Asp Leu Pro Asp His Ile Glu Val Asn Ser Gly Lys Phe Asn Pro			
	355	360	365	
25	Ile Cys Lys Ala Ser Gly Trp Pro Leu Pro Thr Asn Glu Glu Met Thr			
	370	375	380	
	Leu Val Lys Pro Asp Gly Thr Val Leu His Pro Lys Asp Phe Asn His			
	385	390	395	400
30	Thr Asp His Phe Ser Val Ala Ile Phe Thr Ile His Arg Ile Leu Pro			
	405	410	415	
	Pro Asp Ser Gly Val Trp Val Cys Ser Val Asn Thr Val Ala Gly Met			
	420	425	430	
35	Val Glu Lys Pro Phe Asn Ile Ser Val Lys Val Leu Pro Lys Pro Leu			
	435	440	445	
	Asn Ala Pro Asn Val Ile Asp Thr Gly His Asn Phe Ala Val Ile Asn			
	450	455	460	
40	Ile Ser Ser Glu Pro Tyr Phe Gly Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr			
	465	470	475	480
	His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser			
	485	490	495	
	Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg			
	500	505	510	
50	Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro			
	515	520	525	
	Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala			
	530	535	540	
55	Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val			
	545	550	555	560
	Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr			
	565	570	575	
60	Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr			
	580	585	590	

# ES 2 262 518 T5

	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu			
	595	600	605	
5	Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys			
	610	615	620	
	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser			
	625	630	635	640
10	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp			
	645	650	655	
	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser			
15	660	665	670	
	Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala			
	675	680	685	
20	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
	690	695	700	

25

30

35

40

45

50

55

60

65