



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 300 516**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/567 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 14/71 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **03009148 .2**

(86) Fecha de presentación : **15.11.1993**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1378570**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **07.01.2004**

(54) Título: **Receptor Flk-1 dominante negativo unido a la membrana del factor de crecimiento endotelial vascular.**

(30) Prioridad: **13.11.1992 US 975750**
26.03.1993 US 38596

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.06.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.06.2008

(73) Titular/es: **Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung
der Wissenschaften e.V.**
Bunsenstrasse 10
D-37073 Göttingen, DE

(72) Inventor/es: **Ullrich, Axel;**
Risau, Werner y
Millauer, Birgit

(74) Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 300 516 T3

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

DESCRIPCIÓN

Receptor Flk-1 dominante negativo unido a la membrana del factor de crecimiento endotelial vascular.

5 1. Introducción

La presente invención se refiere al uso de ligandos para el receptor FLK-1 para la modulación de la angiogénesis y de la vasculogénesis. La invención se basa, en parte, en la demostración de que la expresión del receptor de tirosina quinasa Flk-1 está asociada a las células endoteliales y a la identificación del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) como el ligando de gran afinidad de Flk-1. Estos resultados indican una función del Flk-1 más importante en el sistema de señales durante la vasculogénesis y la angiogénesis. Se describe la ingeniería de las células huéspedes que expresan el Flk-1 y las utilidades del Flk-1 para valorar y seleccionar medicamentos y análogos del VEGF implicados en la modulación del Flk-1 mediante actividades agonistas o antagonistas.

La invención también se refiere al uso de ligandos para FLK-1, incluyendo agonistas y antagonistas, en el tratamiento de enfermedades, incluyendo cáncer, por vasculogénesis y angiogénesis de modulación.

2. Base de la invención

Las tirosinas quinasas receptoras están constituidas por una gran familia de receptores transmembrana para los factores del crecimiento polipéptido con diversas actividades biológicas. Su función intrínseca de tirosina quinasa se activa por el enlace con el ligando que produce la fosforilación del receptor y múltiples substratos celulares, y posteriormente, una variedad de respuestas celulares (Ullrich A. y Schlessinger, J., 1990, Cell 61:203-212).

Un ADNc receptor de la tirosina quinasa denominado quinasa del hígado fetal 1 (Flk-1), fue clonado a partir de unas poblaciones celulares de ratón enriquecidas para células madre y progenitoras hematopoyéticas. Se sugirió la implicación del receptor en la renovación de la célula madre hematopoyética (Matthews *et al.*, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9026-9030). El análisis de las secuencias del clon Flk-1 reveló una homología considerable con la subfamilia c-Kit de quinasas receptoras y en particular al producto genético *Flt*. Todos estos receptores tienen en común un dominio extracelular que contiene estructuras del tipo de la inmunoglobulina.

La formación y la extensión de los vasos sanguíneos, o vasculogénesis y angiogénesis respectivamente, tienen unas funciones importantes en una variedad de procedimientos fisiológicos como, por ejemplo, el desarrollo embrionario, la cicatrización de heridas, la regeneración de órganos y los procedimientos de reproducción femeninos, tales como el desarrollo folicular en el cuerpo lúteo durante la ovulación y el crecimiento de la placenta después del embarazo. La angiogénesis descontrolada puede ser patológica tal y como sucede en el crecimiento de tumores sólidos que dependen de la vascularización para el crecimiento.

La angiogénesis implica la proliferación, migración e infiltración de células endoteliales vasculares, y puede ser regulada por factores de crecimiento de los polipéptidos. Se han identificado varios polipéptidos con crecimiento de célula endotelial *in vitro* que aceleran la actividad. Algunos ejemplos son: el factor de crecimiento fibroblástico ácido y básico, el factor de crecimiento endotelial vascular y el factor de crecimiento de la placenta. Aunque se han caracterizado cuatro receptores diferentes para los distintos miembros de la familia FGF (factor de crecimiento fibroblástico), hasta el momento no se ha notificado que ninguno de estos se exprese en los vasos sanguíneos *in vivo*.

Aunque los FGFs parecen ser mitógenos para una gran variedad de células diferentes, se ha notificado recientemente que el VEGF es un mitógeno específico de la célula endotelial (Ferrara, N. and Henzel, W.J., 1989, Biochem. Biophys. Res. Comm. 161:851-858). Recientemente, se ha demostrado que el receptor de la tirosina del tipo *fms* llamado *flt*, tiene afinidad para el VEGF (DeVries, C. *et al.* 1992, Science 255:989-991).

50 3. Resumen de la invención

El objeto de la presente invención está definido en las reivindicaciones. La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que el receptor de la tirosina quinasa Flk-1 es expresado en la superficie de las células endoteliales y la identificación del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) como un ligando de gran afinidad de Flk-1. El papel de la proliferación y de la migración de las células endoteliales durante la angiogénesis y la vasculogénesis indica una función importante del Flk-1 en estos procesos. Se describe la invención a modo de ejemplo para el Flk-1 murino, no obstante, se pueden aplicar los principios a otras especies, seres humanos incluidos.

Los reactivos farmacéuticos diseñados para inhibir la interacción Flk-1/VEGF pueden ser útiles en la inhibición del crecimiento tumoral. Se puede utilizar VEGF y/o agonistas de VEGF para promover el cicatrizado de heridas. Las líneas celulares creadas por ingeniería genética que expresan Flk-1 en su superficie pueden ser ventajosamente empleadas para seleccionar e identificar a los agonistas y antagonistas de VEGF.

65 4. Breve descripción de las figuras

Fig. 1. Comparación de la secuencia de aminoácidos Flk-1 con RTKs (receptores de membrana con actividad intrínseca tirosínquinasa) relacionados. Comparación de la secuencia de aminoácidos de Flk-1 con KDR humano y

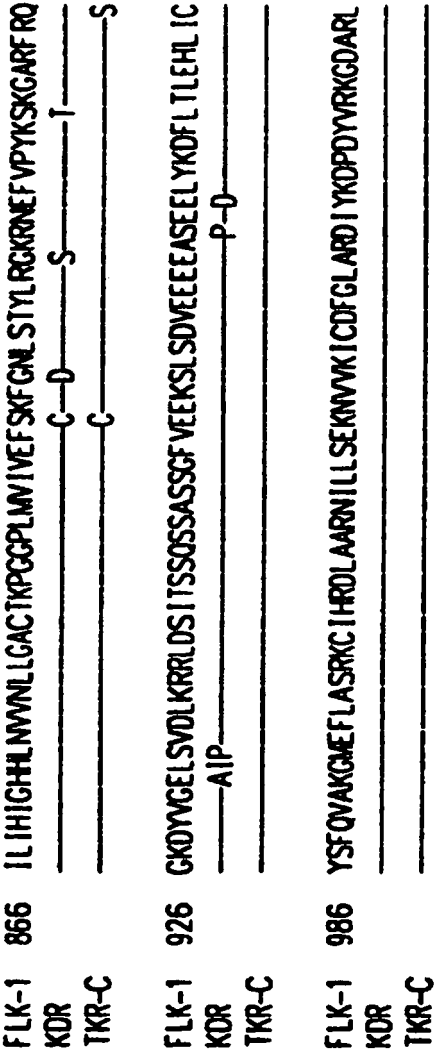


FIG.1

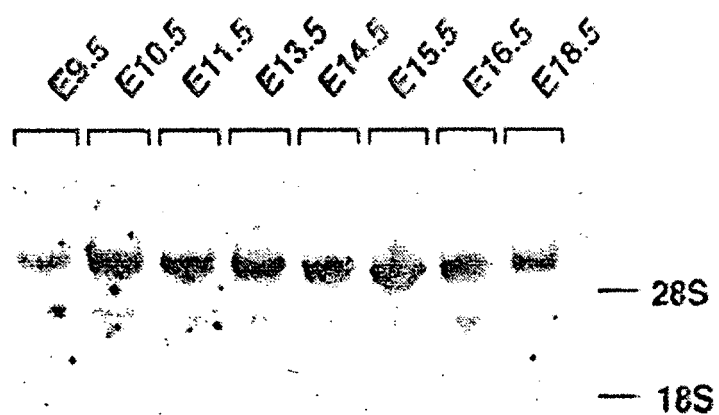


FIG. 2A

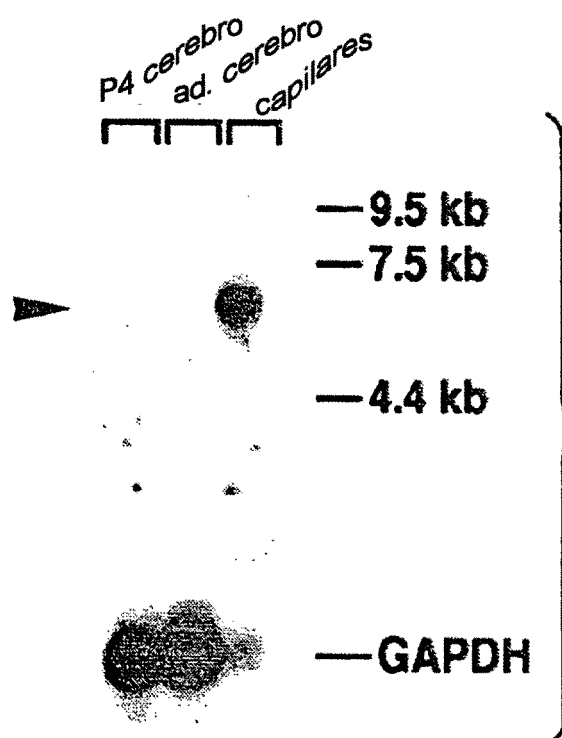


FIG. 2B

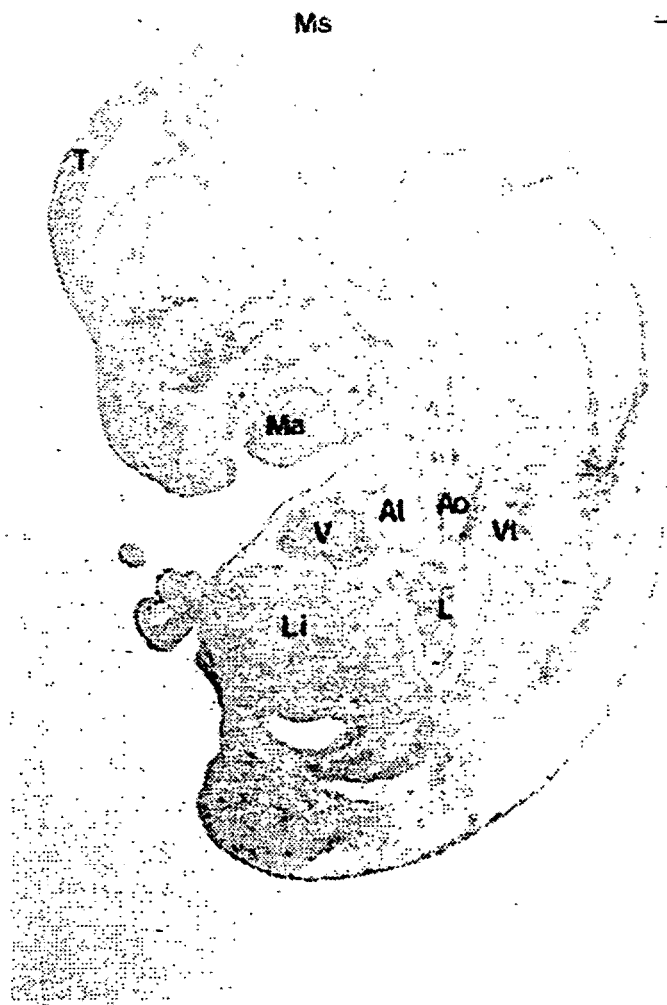


FIG. 3A

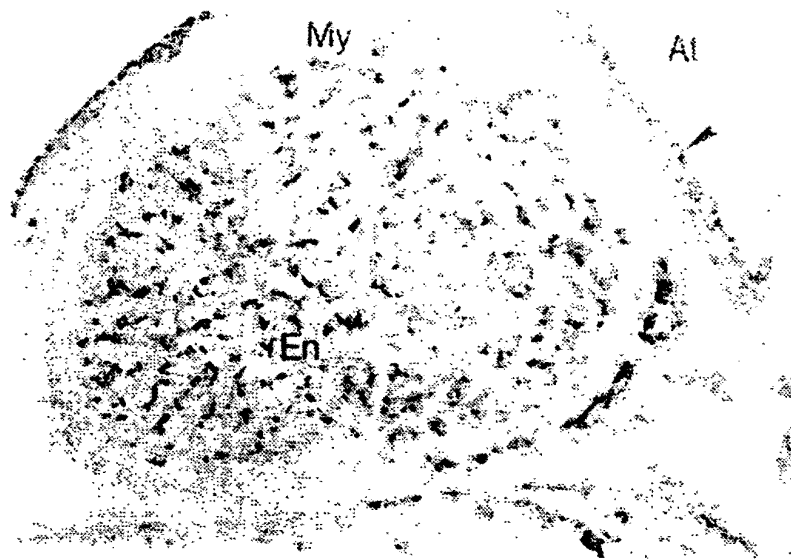


FIG. 4A



FIG. 4B

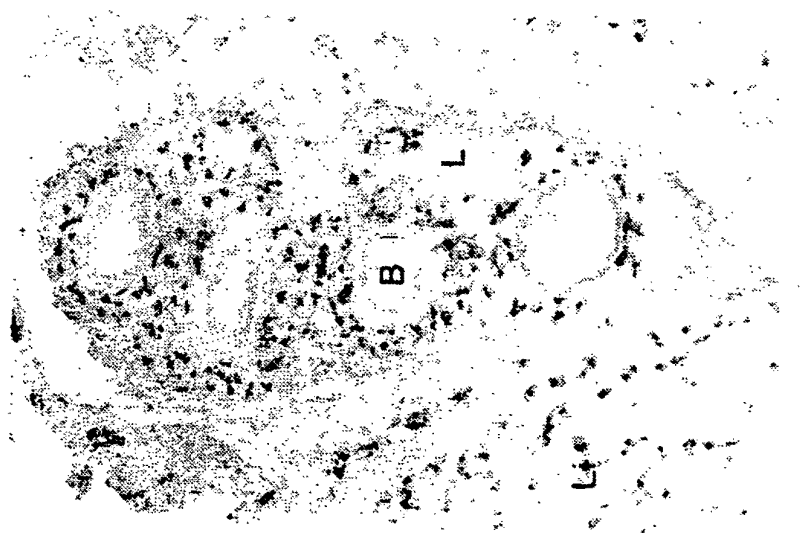


FIG. 4D

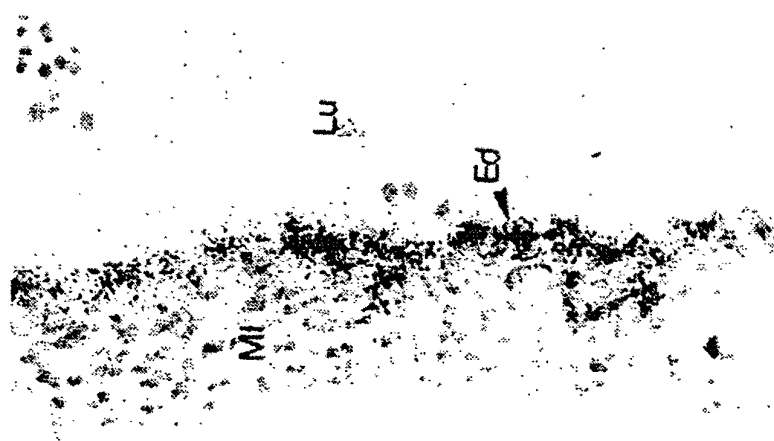


FIG. 4C

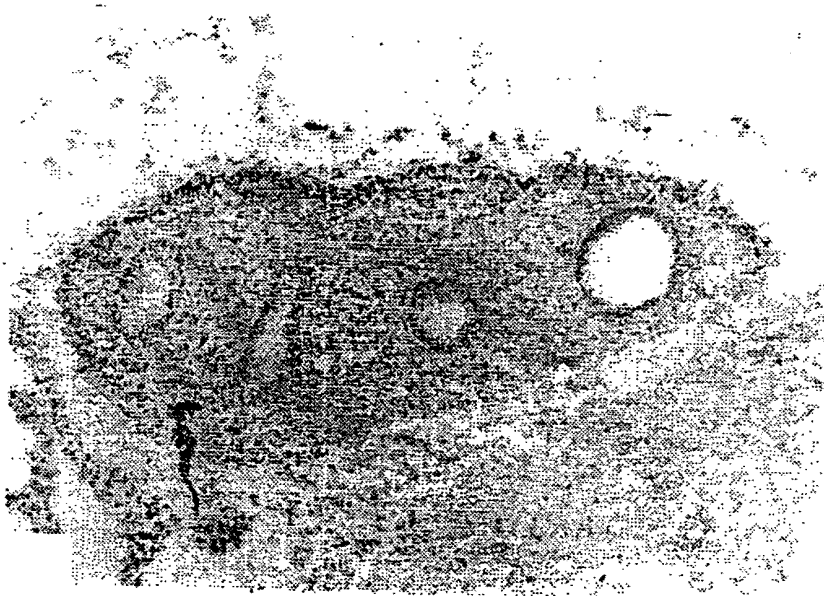


FIG. 4E

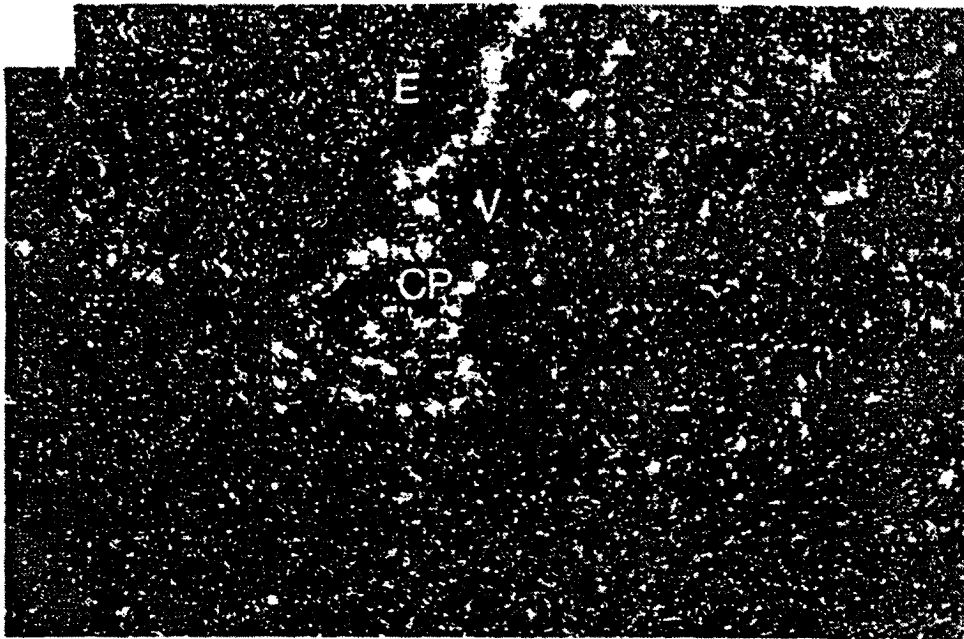


FIG. 6A

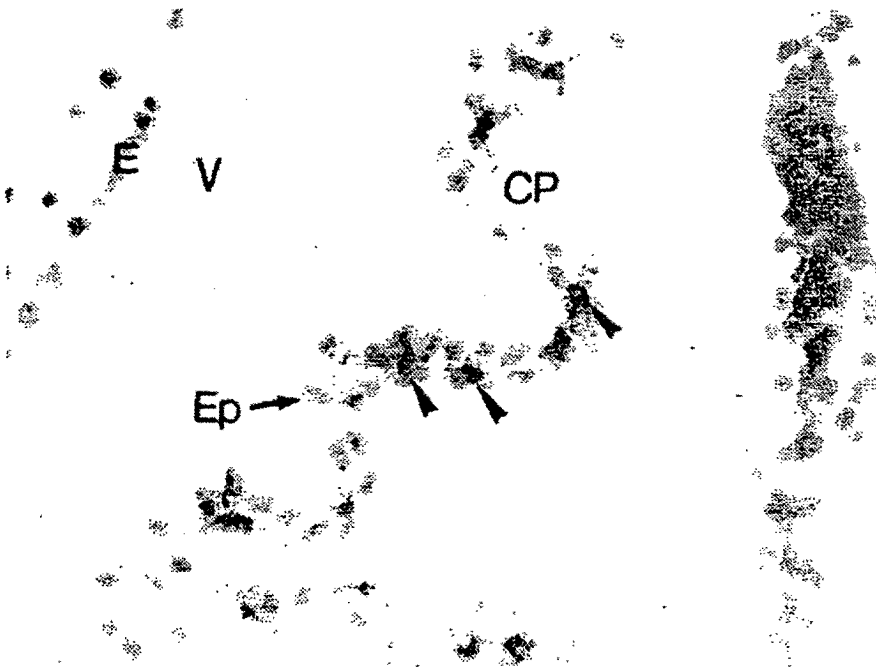


FIG. 6B

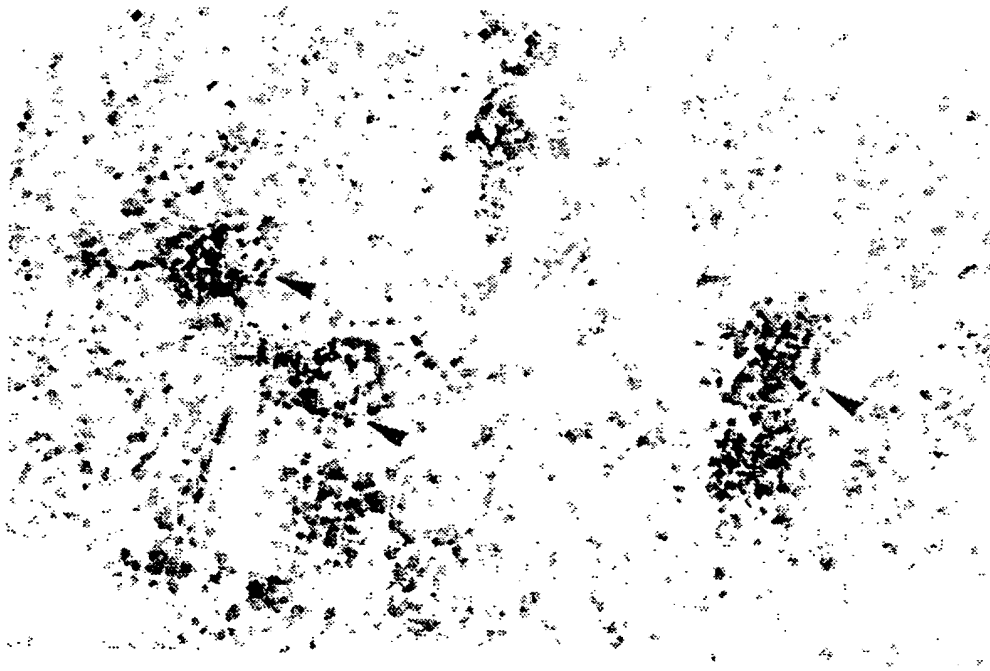


FIG. 7C

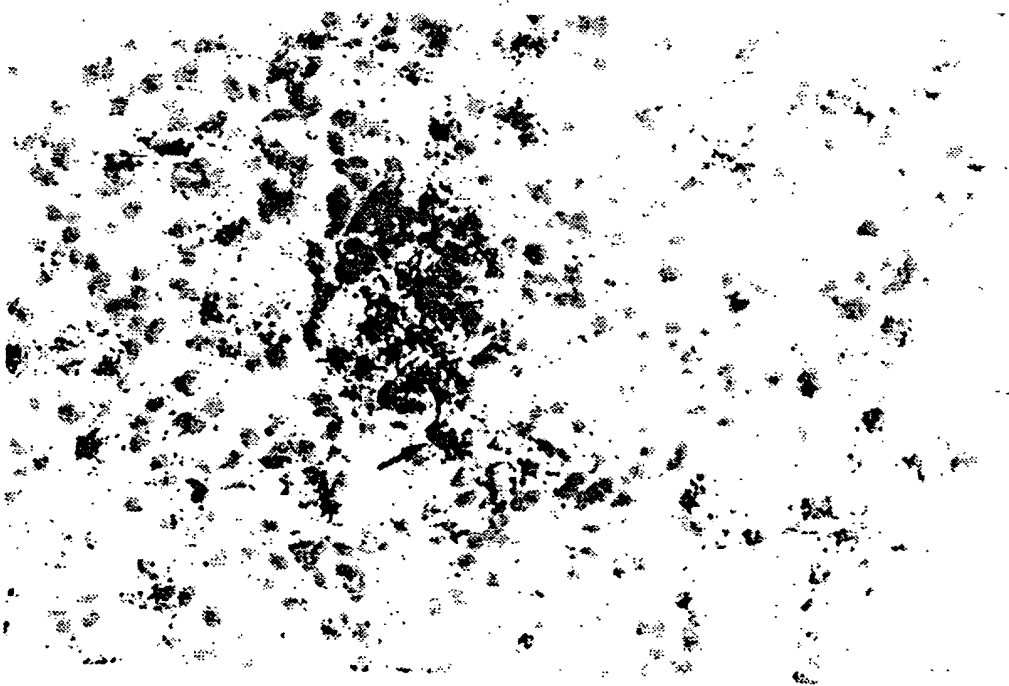


FIG. 7D

DOCU

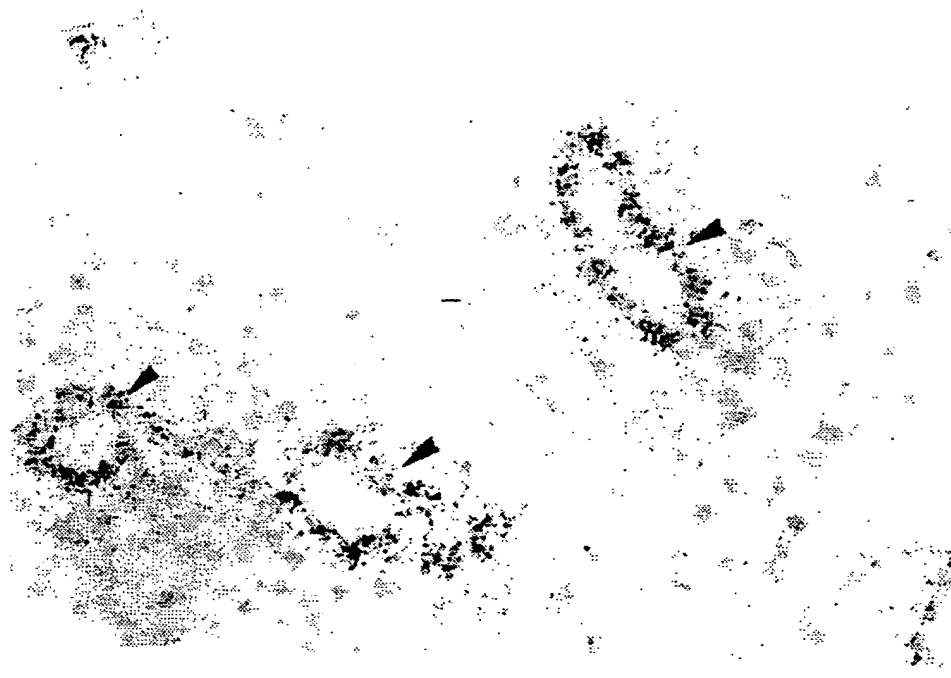


FIG. 8B

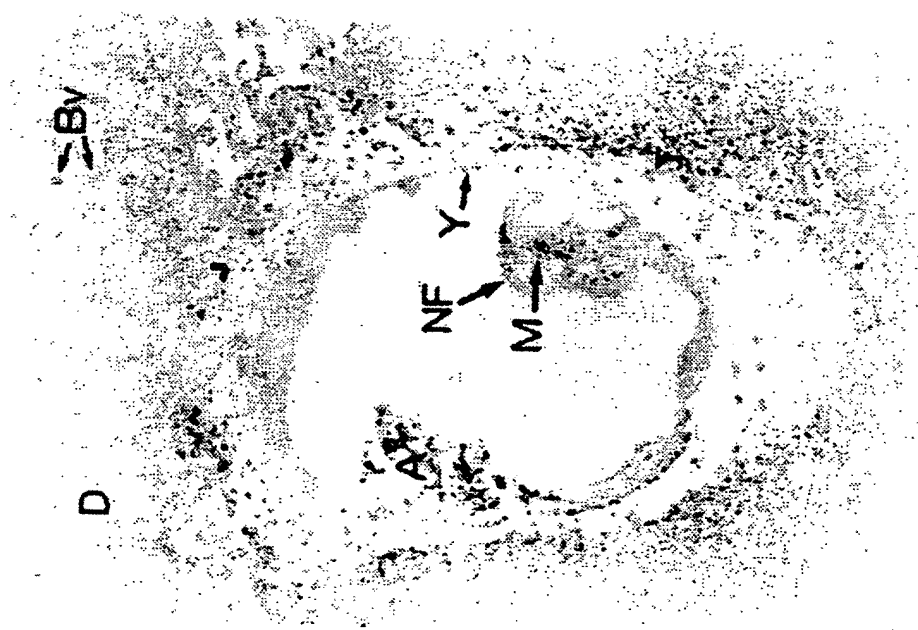


FIG. 8A

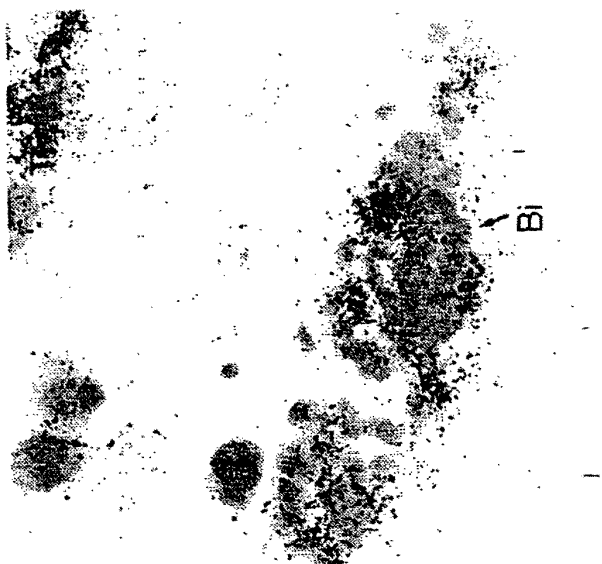


FIG. 8D

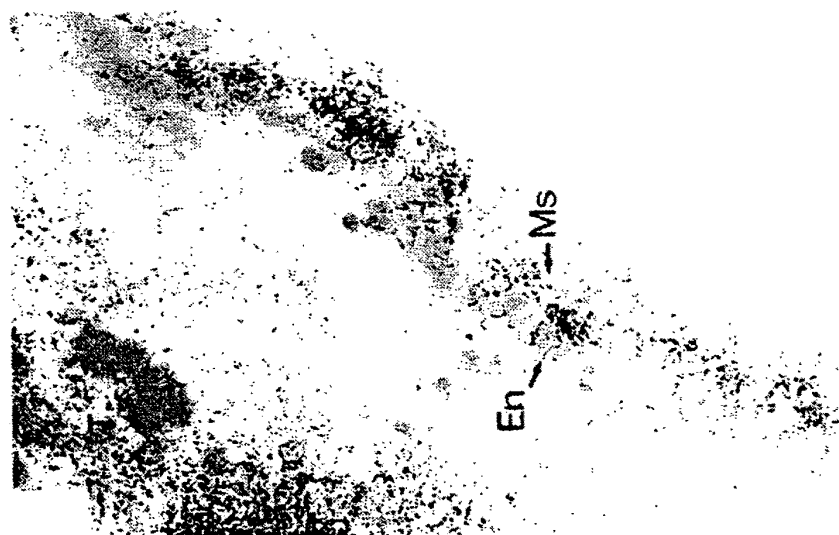


FIG. 8C

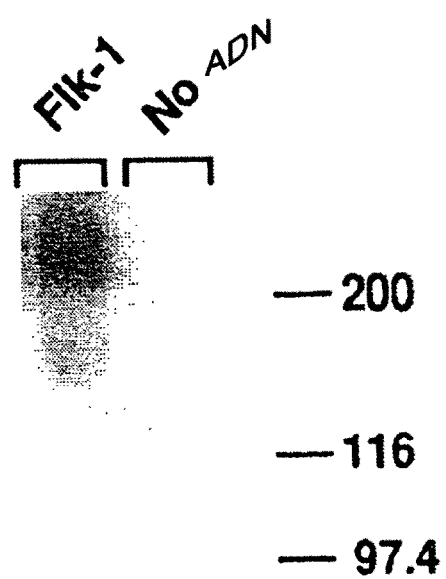


FIG. 9A

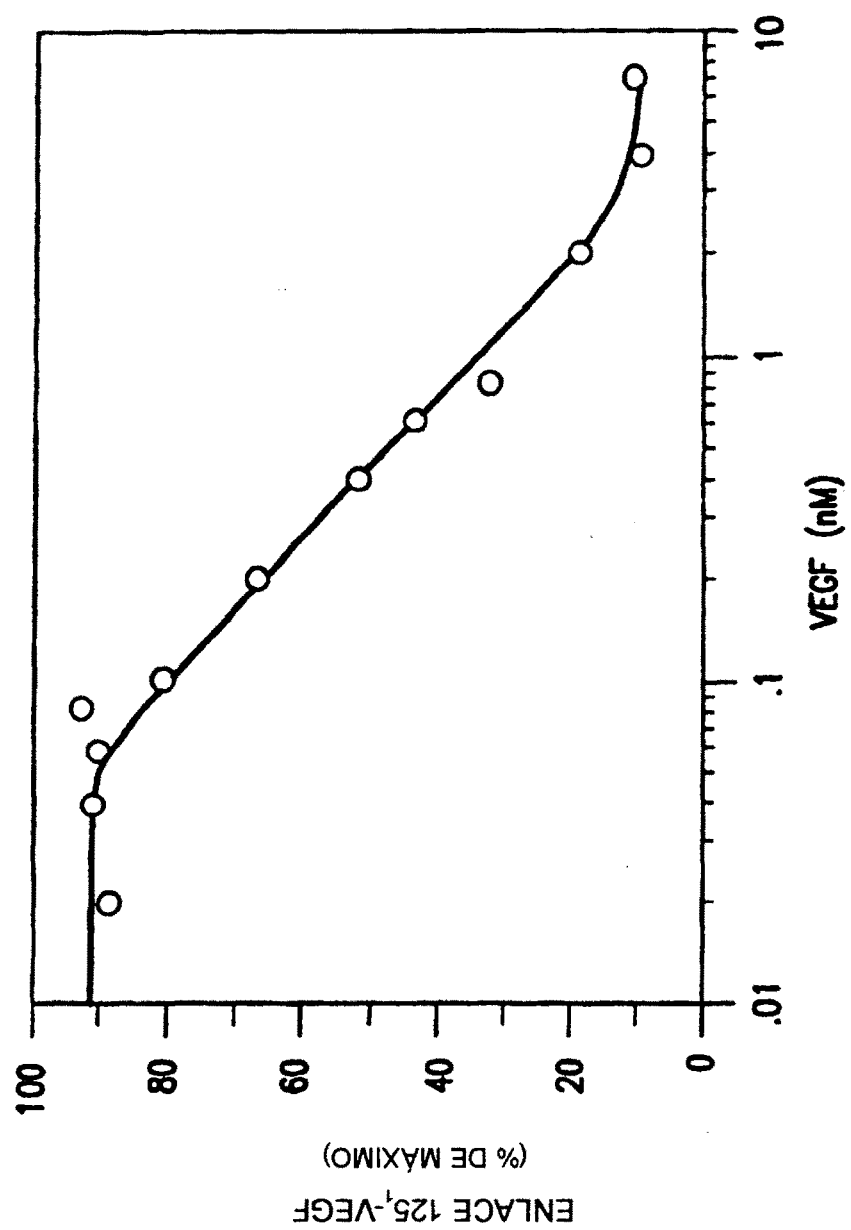


FIG.9B

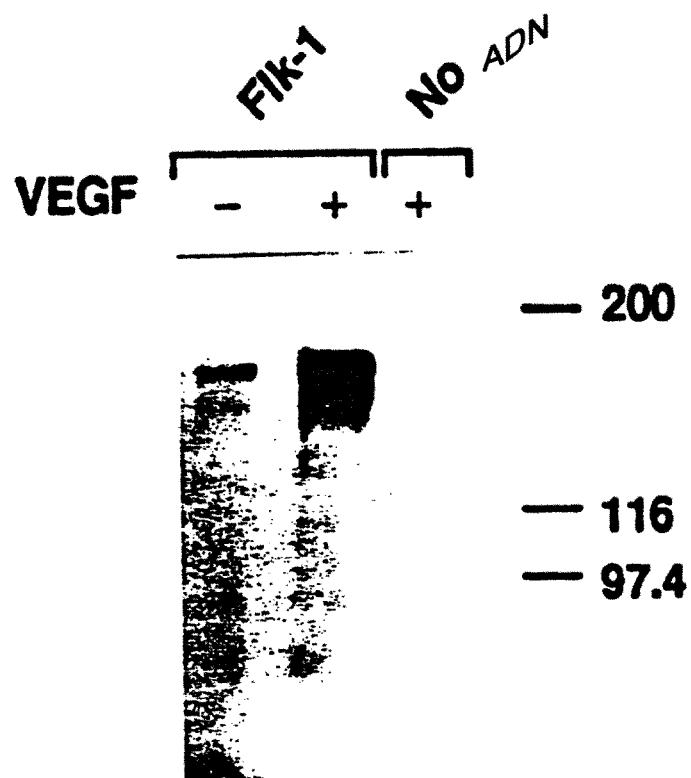


FIG. 10

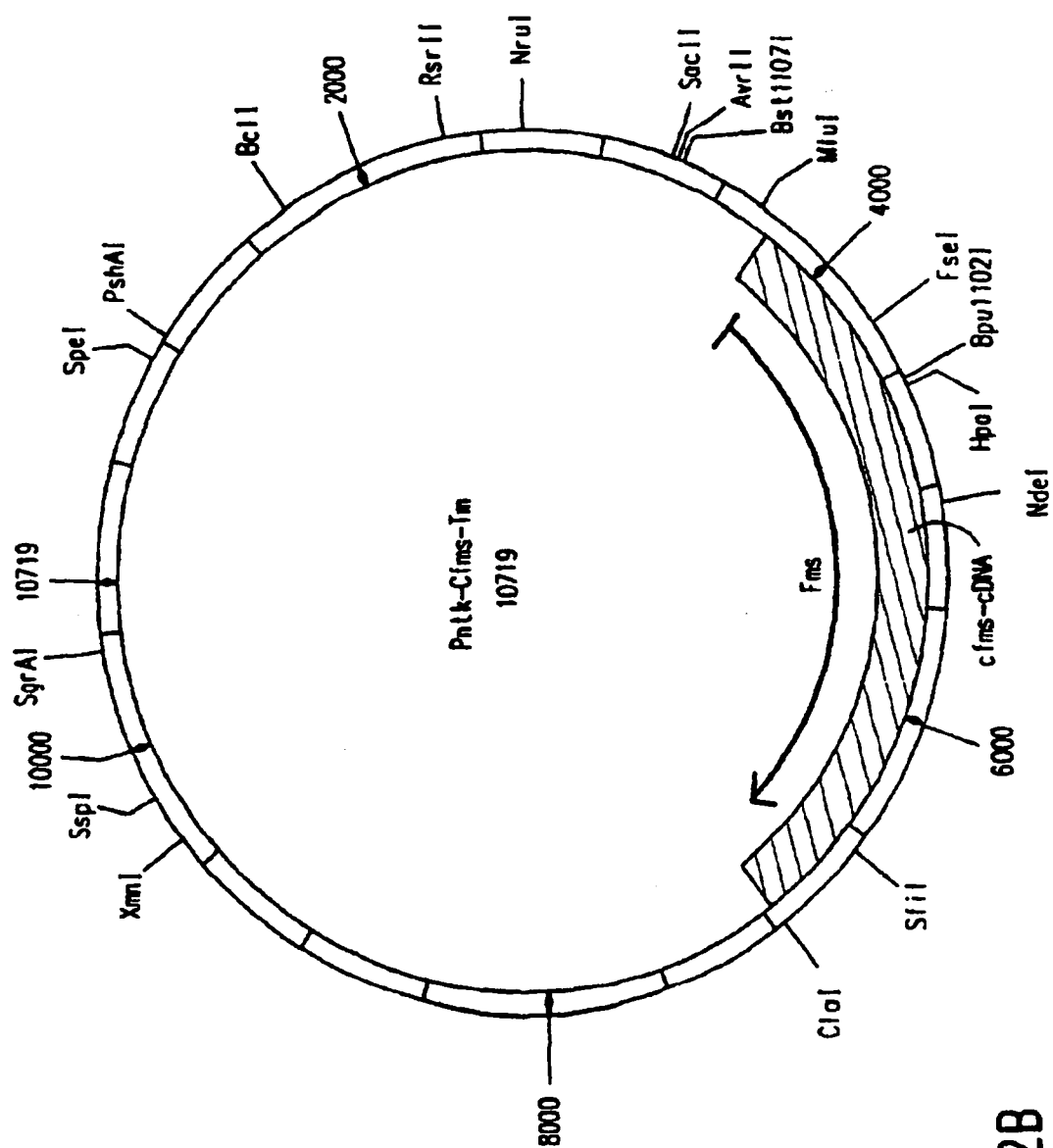


FIG.12B

