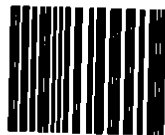


PETITORIO

Industria y Co
SUPERINTEND



01 38482

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO
Radicación: 01035462 00000000 Folios: 168
Fecha (MPD): 2001-05-09 17:09:23
Trámite: 002 PATENTES D 1 REGISTRAL/ 411 PRESENTAC^{ón}
Dependencia: 2000 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE 2000-3

1 SOLICITUD DE: ☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad			
2 S LICITANTE (71)	Nombre: BAYER CORPORATION ✓ Sociedad constituida y existente bajo las leyes del Estado de Indiana, Estados Unidos de América Dirección: 100 Bayer Road, Pittsburg, Pennsylvania 15205, Estados Unidos de América. ✓ Teléfono: 546 09 70 E-mail: clientes@camyp.com Fax: 249 40 70 Domicilio: Pittsburg, Pennsylvania, Estados Unidos de América. ✓		
IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número: _____			
3 REPRESENTANTE O APODERADO (74)	Nombre: Emilio Ferrero ✓ Dirección: Carrera 4ª No. 72-35 ✓ Teléfono: 347 36 11 E-mail: cavalier@cavalier.com Fax: 217 92 11 Domicilio: Bogotá, Colombia		
IDENTIFICACION C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número: 438.019 TP 31.829			
4 INVENTOR(ES) (72)	Nombre: 1- Steve ROCZNIAC ✓ 2- Nathalie A. DUBOIS-STRINGFELLOW 3- Alya ZOLOTOREV Dirección: 1- 11 Hidden Valley Road, Lafayette, California 94549, Estados Unidos. ✓ 2- 1008 The Alameda, Berkeley, California 94707, Estados Unidos. 3- 1750 Arrowhead Drive, Oakland, California 94611, Estados Unidos.		
IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número: _____			
5 TITULO (54) MÉTODO PARA REGULAR LA ANGIOGÉNESIS UTILIZANDO PROTEÍNA RYK			
6 Clasificación Internacional (51) C07K14/705, A61K38/30			
7 Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen US	(32) Fecha 10 de mayo de 2000 ✓	(31) Número de Solicitud 09/568.783 ✓
8 Para publicar a partir de la fecha de la presente solicitud a los 6 meses ☐ 12 meses ☐ 18 meses ☒ Otro ☐			
9 Comprobante de pago No. 01-21.051 por \$356.640.00 Fecha 2 de abril de 2001 Comprobante de pago No. 01-16.205 por \$100.000.00 Fecha 12 de marzo de 2001			

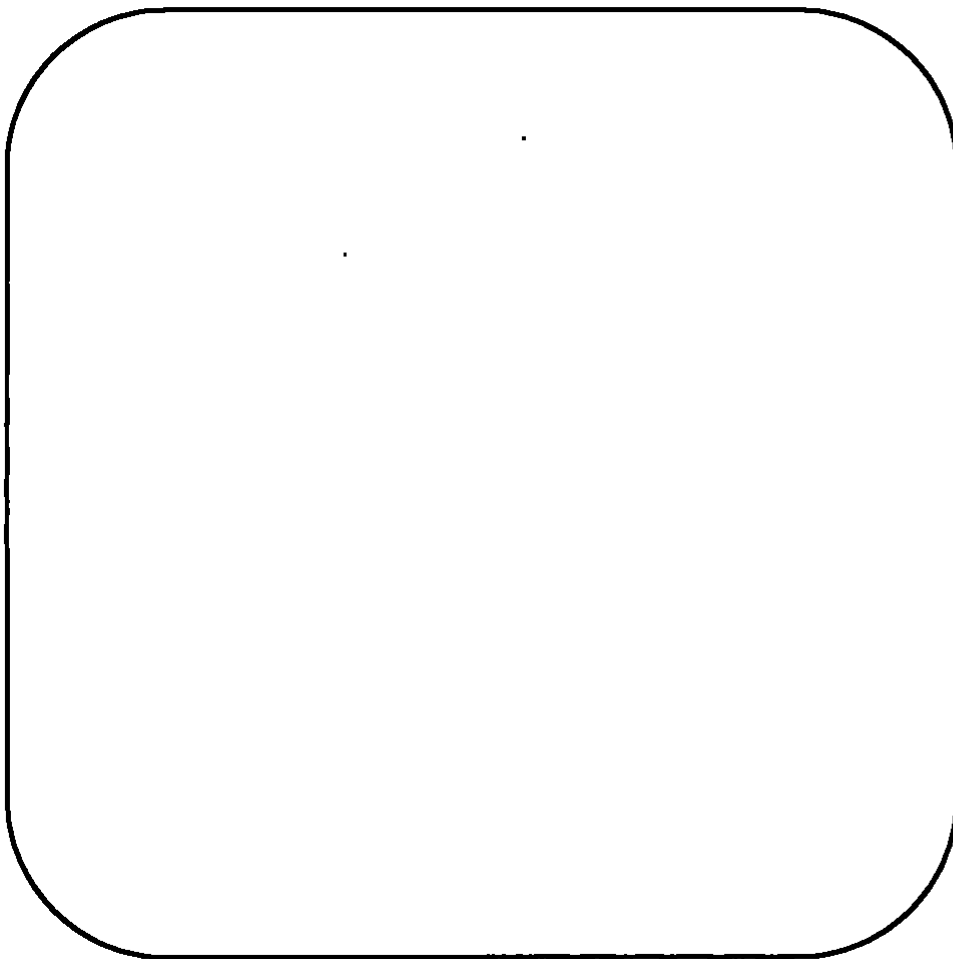
ANEXOS

10

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación
- ☒ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- ☒ Certificado de existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Poderes, si fuere el caso
- ☒ Copia certificada de la primera solicitud, si se reivindica prioridad *MSA No. 09/568.783*
- ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☒ Descripción de la invención
- ☒ Una o más reivindicaciones
- ☒ Dibujos y/o planos necesarios *(15 pago.)*
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

NOMBRE: EMILIO FERREROFIRMA: *Emilio Ferrero*

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

MÉTODO PARA REGULAR LA ANGIOGÉNESIS UTILIZANDO PROTEÍNA RYK

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo. Esta invención se relaciona con un método para regular la angiogénesis utilizando polipéptidos recientemente identificados o los polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos. Más específicamente, el método comprende el uso de la proteína Ryk, o fragmentos derivados de la misma, para regular la angiogénesis en tejidos animales o humanos.

Antecedentes. Ryk es un miembro de la familia del Receptor Tirosina Cinasa (RTK) que tiene actividad catalítica deteriorada y cuyo(s) ligando(s) aún no han sido identificados. Ryk ha sido descrita por Stacker y otros en la publicación WIPO WO 93/23429 (Sol. No. PCT/AU93/00210). El marco de lectura abierto de la Ryk humana codifica 607 aminoácidos (aa), tiene 2 dominios potenciales tras la membrana y exhibe íntima homología en su dominio catalítico (es decir, activación y unión de nucleótidos) con las RTK tales como met (HGF/SF-R) e IGF-IR (Tamagnone y otros, Oncogene 1993, 8:2009). La región catalítica de Ryk demuestra homología más estrecha con v-sea (39 %) (Wang y otros, Mol. Med. 1996, 2:189). Ryk difiere de los demás miembros de la familia RTK en un número de residuos conservados de su dominio catalítico (Katso y otros, Mol. Cell. Biol. 1999; 19:6427). Las sustituciones de aminoácidos en este dominio dan cuenta de la incapacidad de Ryk para sufrir la autofosforilación o para fosforilar sustratos. Sin embargo, la estimulación de ligandos de un receptor quimérico de Ryk da como resultado la activación de la ruta de la cinasa proteica activada por mitógenos (Katso y otros, Mol. Cell. Biol. 1999; 19:6427).

Ryk no exhibe una homología considerable en su dominio extracelular con otras familias de RTK. Ryk tiene un dominio extracelular relativamente pequeño.

Varios autores han descrito variaciones de la secuencia de aminoácidos/

nucleótidos de Ryk. (Ver, por ejemplo, Tamagnone y otros, *Oncogene* 1993, 8:2009 (se describe al dominio celular con una secuencia de aminoácidos que consiste en 191 aminoácidos) y Halford y otros, *J. Bio. Chem.* 1999, 274:7379 (se describe al dominio extracelular como poseedor de la misma secuencia de aminoácidos descrita por Tamagnone; sin embargo, hay diez aminoácidos faltantes en el término C, lo que hace que el dominio extracelular sea de 181 aminoácidos). No obstante, todos los dominios extracelulares de Ryk descritos en la literatura contienen cinco sitios potenciales de glicosilación N-ligados (Stacker y otros, *PNAS* 1992, 89:11818). Las secuencias de ryk humana y de ratón son 92 % idénticas al nivel de los nucleótidos y 97 % idénticas al nivel de los aminoácidos (Stacker y otros, *PNAS* 1992, 89:11818).

Los estudios inmunoquímicos de tejidos normales han indicado que Ryk es expresada en el epitelio, los estromas y los vasos sanguíneos (Katso y otros, *Cancer Res.* 1999, 59:2265). Los análisis de Transferencia Northern (Northern Blot) demuestran la presencia del ARNm de Ryk en numerosos tejidos, incluyendo en el corazón, cerebro, pulmones, placenta, hígado, músculos, riñones y páncreas (Wang y otros, *Mol. Med.* 1996: 2:189). Los análisis de hibridación in situ han demostrado que el gen Ryk es expresado casi exclusivamente en los compartimientos epiteliales y estromales del cerebro, pulmones, colon, riñones y mamas (Wang y otros, *Mol. Med.* 1996: 2:189). El Ryk ARN está presente en niveles considerablemente incrementados en la capa basal de los epitelios de la piel y la lengua y en la capa intervellosa y algunas bases de las criptas del intestino (Serfas y otros, *Oncogene* 1998, 18:3435). Ryk es inducida en las células epiteliales en la búsqueda de un punto final en un tejido diferenciado o durante la remodelación del endometrio, y se ha creado la hipótesis de que está implicada en el reconocimiento celular (Serfas y otros, *Oncogene* 1998; 17:3435).

La Ryk humana es sobreexpresada en tumores ováricos en punto límite ("borderline") y malignos (Katso y otros, Cancer Res. 1999, 59:2265). En subtipos de tumores de células serosas y claras, se observa una expresión incrementada en el epitelio, los estromas y los vasos sanguíneos. En tumores malignos, la expresión aumentada está confinada predominantemente al epitelio (Wang y otros, Mol. Med. 1996, 2:189). Se ha aislado ADNc de Ryk de una genoteca de ADN complementario de SKOV-3, una línea celular epitelial de cáncer ovárico, utilizando PCR (Wang y otros, Mol. Med. 1996; 2:189). Se presenta una mínima a ausente expresión de Ryk humana en el epitelio superficial de ovarios normales. La sobreexpresión de Ryk en la línea celular de fibroblastos de ratón NIH3T3 induce desarrollo independiente del anclaje y tumorigenicidad en ratones calvos (Katso y otros, Cancer Res. 1999: 59:2265). Estas observaciones sugieren que Ryk puede estar implicada en el progreso de los tumores.

RYK es la homóloga mamífera de la proteína Lio de Drosophila que, según se ha determinado, está implicada en el aprendizaje y la memoria y la guía de axones (selección de rutas) en el embrión y el adulto (Moreau-Fauvarque y otros, Mech. Dev. 1998; 78:47). Lionette fue identificada en rastreos de defectos de la guía axonal del sistema nervioso embrionario denominados descarrilamientos. Los mutantes de Lionette (descarrilados) son viables, aunque presentan defectos estructurales cerebrales en el complejo central del adulto, donde los axones centrales del cerebro se comportan como si fueran anormalmente atraídos por el área cerebral media. En los embriones mutantes descarrilados, una pequeña serie de interneuronas que expresaban el gen fueron incapaces de efectuar las elecciones correctas de ruta (Callahan y otros, Nature 1995: 376:171).

Ryk es expresada en células T CD3, CD4 y CD8, células pre-T, células epiteliales del timo y células mieloides maduras, aunque no en precursores mieloides o precursores de células B (Simoneaux y otros, J. Immunol. 1995; 154:1157). Se

observa la expresión de Ryk en células diferenciadas (Lin+) pero no en células precursoras (Lin-), y se planteó la hipótesis de que la expresión de Ryk puede ser regulada durante el desarrollo hematopoyético por el compromiso a una progenie y la etapa de maduración.

Ryk es expresada asimismo por una pequeña subserie de músculos embrionarios en desarrollo y células epidérmicas lindantes durante la selección del sitio de unión muscular (Callahan y otros, Development 1996, 122:2761). En mutantes descarrilados, los músculos frecuentemente dejan de adherirse en los sitios apropiados, si bien sus células de adhesión epidérmica parecen indemnes.

La angiogénesis, la formación de nuevos capilares a partir de los vasos sanguíneos existentes, es un proceso de etapas múltiples, muy altamente orquestada que conlleva la reproducción de vasos, migración de las células endoteliales, la proliferación, diferenciación del tubo y supervivencia. En la actualidad, varias líneas de evidencia directa sugieren que la angiogénesis es esencial para el desarrollo y persistencia de tumores sólidos y sus metástasis (Folkman y otros (1989) Nature 339:58-61; Hori y otros (1991) Cancer Research 51: 6180-84, Kim y otros (1993) Nature 362: 841-844, Millauer y otros (1996) Cancer Research 56: 1615-20). Para estimular la angiogénesis, los tumores aumentan la regulación de su producción de una diversidad de factores angiogénicos, incluyendo los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF y BFGF) (Kandel y otros (1991) Cell. 66: 1095-104) y el factor de crecimiento de células endoteliales vasculares/factor de permeabilidad vascular (VEGF/VPF). Sin embargo, muchos tumores malignos también generan inhibidores de la angiogénesis, entre los que se incluyen la angiostatina y la trombospondina (Chen y otros (1995) Cancer Research 55: 4230-33, Good y otros (1990) Proc Natl Acad Sci U.S.A. 87: 6624-28; O'Reilly y otros (1994) Cell 79: 315-28). Se sugiere que el fenotipo angiogénico es el resultado de un balance neto entre estos reguladores

positivos y negativos de la neovascularización (Good y otros (1990), obra ya mencionada; O'Reilly y otros (1994) obra citada; Parangi y otros (1996) Proc Natl Acad Sci U.S.A. 93: 2002-07; Rastinejad y otros (1989) Cell 56: 345-55).

Se han identificado varios inhibidores endógenos más, si bien no todos están asociados con la presencia de un tumor. Entre estos se encuentra el factor plaquetario 4 (Gupta y otros (2000) Blood 95: 147-55), el interferón alfa, la proteína 10 inducible por interferón (Angiolillo y otros (1996) Ann. N.Y. Acad. Sci. 795: 158-67; Strieter y otros (1995) J. Biol. Chem. 270: 27348-57), que es inducido por interleucina 12 y/o interferón gama, gro-beta (Cao y otros (1995) J. Exp. Med. 182: 2069-77) y el fragmento N-terminal de 16 kDa de prolactina (Clapp y otros (1999) invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 40: 2498-505). El único inhibidor conocido de la angiogénesis que específicamente inhibe la proliferación de las células endoteliales es la angiostatina (O'Reilly y otros (1994), obra citada). La angiostatina es un inhibidor específico de 38 kiloDalton (kDa) de la proliferación de las células del endotelio. La angiostatina es un fragmento interno del plasminógeno que contiene por lo menos tres de los cinco "kringles" del plasminógeno. Se ha demostrado que la angiostatina reduce el peso de los tumores e inhibe la metástasis en ciertos modelos de tumores (O'Reilly y otros (1994), obra citada). Los ensayos utilizados para medir el efecto sobre la actividad angiogénica incluyen el ensayo de la cavidad corneal (invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1999, 40, 2498-505), el ensayo de angiogénesis de la membrana corioalantoica (CAM) (Am. J. Pathol. 1983, 111(3): 282-7) y los ensayos de proliferación y migración de las células endoteliales (Biochem. Biophys. Res. Comm. 2000, 271: 499-508).

SÍNTESIS DE LA INVENCION

Hemos descubierto recientemente que la proteína Ryk posee una novedosa actividad biológica en la regulación de la angiogénesis. Esta actividad

ha sido puesta de manifiesto en ensayos in vitro e in vivo para la detección de moléculas con actividad en la modulación de la angiogénesis. Se midió la actividad empleando proteínas Ryk variantes. En la presente, la expresión "proteína Ryk variante" incluye una proteína Ryk que carece de la porción tras la membrana de la proteína (por ejemplo, la proteína Ryk de dominio extracelular) o fragmentos derivados de la misma, de acuerdo con lo descrito más adelante, donde la proteína Ryk variante exhibe actividad en la regulación de la angiogénesis.

La presente invención abarca el uso de una proteína Ryk variante para regular o modular la angiogénesis. La presente invención abarca asimismo el uso de una proteína Ryk variante para el tratamiento de una enfermedad o trastorno clínico en que la angiogénesis es relevante para el origen o tratamiento de la enfermedad o trastorno clínico, incluyendo, aunque sin limitarse al cáncer, la cicatrización de heridas, las retinopatías diabéticas, la degeneración macular y las enfermedades cardiovasculares. Entre otros usos de la proteína se cuentan el tratamiento de afecciones clínicas que implican la angiogénesis en el aparato reproductor, incluyendo la regulación de la vascularización placentaria o el uso como abortivo. La presente invención se relaciona asimismo con composiciones farmacéuticas que contienen una proteína Ryk variante y con el uso de las composiciones farmacéuticas para el tratamiento de las enfermedades o trastornos clínicos antes mencionados.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se presentan novedosos polipéptidos maduros que comprenden la secuencia de aminoácidos expuesta en la Figura 1 (SEC. ID. NO: 1), así como fragmentos, análogos y derivados de los mismos biológicamente activos y de uso diagnóstico o terapéutico. De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se presentan novedosos polipéptidos maduros que comprenden la secuencia de

aminoácidos expuesta en la figura 2 (SEC. ID. NO: 2), así como los fragmentos, análogos y derivados de los mismos biológicamente activos y de uso diagnóstico o terapéutico. De acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención, se presentan novedosos polipéptidos maduros que comprenden la secuencia de aminoácidos expuesta en la figura 3 (SEC. ID. NO: 3), así como los fragmentos, análogos y derivados de los mismos biológicamente activos y de uso diagnóstico o terapéutico. Como aspecto adicional de la presente invención, se presentan anticuerpos para los polipéptidos de la presente invención, especialmente anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo constituido por las secuencias expuestas en las Figuras 1-3 (SEC. ID. NOS: 1-3) o una secuencia que comparte una identidad de secuencia de por lo menos 60 %, preferentemente por lo menos 70 %, más preferentemente por lo menos 80 %, aun más preferentemente 90 % o muy preferentemente por lo menos 95 % a lo largo de por lo menos 20, preferentemente por lo menos 30, más preferentemente por lo menos 40, aun más preferentemente por lo menos 50 o muy preferentemente por lo menos 100 residuos con las secuencias expuestas en las Figuras 1-3 (SEC. ID. NOS: 1-3).

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se presentan moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican los polipéptidos de la presente invención, incluyendo ARNm, ADN, ADNc, ADN genómico, así como los análogos antisentido de los mismos y los fragmentos biológicamente activos y de uso diagnóstico y terapéutico de los mismos.

De acuerdo con un aspecto más de la presente invención, se presentan procesos para la producción de polipéptidos por técnicas recombinantes mediante el uso de vectores recombinantes. Como aspecto adicional de la presente invención, se presentan células huéspedes procarióticas y/o eucarióticas

recombinantes que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de acuerdo con la presente invención.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se presenta un proceso para utilizar tales polipéptidos o los polinucleótidos que codifican dicho polipéptidos para fines terapéuticos que implican la regulación de la angiogénesis, por ejemplo, el tratamiento del cáncer, la cicatrización de heridas, las retinopatías diabéticas, la degeneración macular, las enfermedades cardiovasculares y los trastornos clínicos que conllevan la angiogénesis en el aparato reproductor, incluyendo la regulación de la vascularización placentaria o uso como abortivo.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se presentan sondas de ácido nucleico que comprenden moléculas de ácido nucleico de longitud suficiente para hibridarse específicamente a un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención.

De acuerdo con otro aspecto adicional de la presente invención, se presentan análisis de diagnóstico para detectar enfermedades o la susceptibilidad a enfermedades relacionadas con mutaciones de una secuencia de ácido nucleico de la presente invención y para detectar la sobreexpresión o subexpresión de los polipéptidos codificados por tales secuencias.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente invención, se presenta un proceso que conlleva la expresión de dichos polipéptidos o polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos, para fines de terapia génica. En este contexto, terapia génica se define como el proceso que consiste en dar lugar a la expresión de secuencias de ácido nucleico de origen exógeno en un individuo para el tratamiento de un trastorno patológico en ese individuo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 ilustra una secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de la proteína Ryk de acuerdo con lo descrito por Tamagnone y otros, así como la correspondiente secuencia nucleotídica.

La Figura 2 ilustra la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de la proteína Ryk de acuerdo con lo descrito por Halford y otros, J. Bio. Chem. 1999, 274:7379, así como la correspondiente secuencia nucleotídica.

La Figura 3 ilustra la secuencia de aminoácidos de una porción del dominio extracelular de la proteína Ryk que consiste en el dominio del factor inhibitorio Wnt (WIF), así como la correspondiente secuencia nucleotídica.

Las Figuras 4A y 4B ilustran el efecto inhibitorio dependiente de la dosis de Ryk-Fc sobre la organización de tipo capilar de HUVEC en una matriz MATRIGEL. Los resultados se expresan en términos de porcentaje del control, que representa la organización de tipo capilar de HUVEC en una matriz MATRIGEL.

La Figura 5 ilustra el efecto inhibitorio dependiente de la dosis del sobrenadante con contenido de Ryk-myc-His sobre la organización de tipo capilar de HUVEC en una matriz MATRIGEL. Los resultados se expresan en términos de porcentaje del control, que representa la organización de tipo capilar de HUVEC en una matriz MATRIGEL.

La Figura 6 ilustra el efecto inhibitorio dependiente de la dosis de Ryk-Fc sobre la organización de tipo capilar de HUVEC en una matriz MATRIGEL en presencia de bFGF, VEGF o IL-8 agregado en forma exógena. Los resultados se expresan en términos de porcentaje del control, que representa la organización de tipo capilar de HUVEC en una matriz MATRIGEL.

Las Figuras 7A y 7B ilustran el efecto inhibitorio dependiente de la dosis de WIF, WIF-Fc, NWIF-his, WIF-his y Ryk-his sobre la organización de tipo capilar de HUVEC en una matriz MATRIGEL en presencia de IL-8 agregada exógenamente.

Los resultados se expresan en términos de porcentaje del control, que representa la organización de tipo capilar de HUVEC en una matriz MATRIGEL.

La Figura 8 ilustra la especificidad de la proteína de fusión Ryk-Fc utilizando el anticuerpo de cadena simple generado contra la proteína de fusión Ryk-Fc (scFv 1B4).

La Figura 9 ilustra el efecto de la expresión de Ryk-Fc sobre el desarrollo de metástasis pulmonares de melanoma B16 in vivo en ratones singeneicos. Se infectaron células B16 ex vivo con un adenovirus que contenía el gen Ryk-Fc y se las implantó en ratones por inyección en la vena tecal. Los resultados se expresan en términos de número de metástasis pulmonares.

La Figura 10 ilustra el efecto de la expresión de Ryk-Fc sobre la angiogénesis in vivo en la córnea de rata. Se implantaron pellets de Hydrón que contenían el agente angiogénico, bFGF recombinante, y cantidades variables de Ryk-Fc, en las córneas de rata y a los siete días se examinó la angiogénesis microscópicamente. Los grados de angiogénesis fueron calificados a ciegas por dos individuos utilizando puntos de referencia.

La Figura 11 ilustra la purificación del anticuerpo anti Ryk scFv utilizando cromatografía de intercambio iónico Mono Q 5/5. Se utilizó un gradiente lineal de NaCl 0 a 0,5 M en buffer Hepes 10 mM para eluir el anticuerpo de la columna de intercambio iónico. Las fracciones fueron monitoreadas por A280 nm y el valor de conductividad. Se encontró, mediante SDS-PAGE, que los picos 1 y 2 eran scFv.

La Figura 12 ilustra la purificación de scFv 1B4 anti Ryk y la eliminación de la endotoxina utilizando cromatografía de intercambio iónico Mono Q 5/5. Se utilizó un gradiente lineal de NaCl 0 a 0,5 M en buffer Hepes 10 mM para eluir el anticuerpo de la columna de intercambio iónico. Se midió la endotoxina a 4,0 UE/ml.

La Figura 13 ilustra una SDS-PAGE del anticuerpo anti Ryk scFv purificado por Mono Q 5/5, altamente purificado a partir de E. Coli. Se resolvió una alícuota de la elución de Mono Q 5/5 (carril 1) y los marcadores de tamaño molecular del tamaño indicado en kDa (carril 2) en un gel bis-tris al 4-12 % (Novex, Carlsbad, CA) y se revelaron con tinción de coomassie.

La Figura 14 ilustra la interacción del anticuerpo anti Ryk scFv con Ryk-Fc. Se utilizó el instrumento BIAcore 2000 para caracterizar la interacción del anticuerpo scFv con Ryk-Fc. Los datos fueron recogidos utilizando por lo menos 6 concentraciones diferentes de Ryk-Fc, inyectadas por duplicado. Todos los experimentos se llevaron a cabo a 25°C utilizando los parámetros descritos en la presente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Las proteínas Ryk variantes de la presente invención comprenden proteínas Ryk de longitud total, de tipo salvaje, que carecen de la porción tras la membrana, haciendo así que la proteína sea soluble. De preferencia, las proteínas Ryk variantes de la presente invención comprenden el dominio extracelular ("DEC") de longitud total, la proteína Ryk de tipo salvaje, o un fragmento del CED que mantiene la capacidad de modular la angiogénesis. Por lo menos dos grupos diferentes han descrito en la literatura ligeras variaciones de la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de la proteína Ryk (ver, por ejemplo, Tamagnone y otros, Oncogene 1993, 8:2009 (se describe al dominio extracelular como constando de una secuencia de aminoácidos de 191 aminoácidos (SEC. ID. NO: 1) y Halford y otros, J. Biol. Chem. 1999; 274:7379 (se describe al dominio extracelular como teniendo la misma secuencia de aminoácidos descrita por Tamagnone; sin embargo, faltan diez aminoácidos en el término C, lo que hace que el dominio extracelular tenga 181 aminoácidos (SEC. ID. NO: 2); estas referencias se incorporan a la presente como referencia

en su totalidad. No obstante, para los fines de la presente invención, se incluye cualquiera y todas las variantes del dominio extracelular de la proteína Ryk que mantienen la capacidad para modular la angiogénesis. Aun más preferentemente, las proteínas Ryk variantes de la presente invención comprenden el dominio de factor inhibitorio Wnt (WIF) del dominio extracelular de la proteína Ryk de tipo salvaje de longitud total (SEC. ID. NO: 3), o un fragmento de la misma que mantiene la capacidad para modular la angiogénesis.

A la luz de lo que antecede, los polipéptidos de la presente invención incluyen a aquellos polipéptidos que tienen las secuencias de aminoácidos deducidas indicadas por SEC. ID. NOS: 1-3. Los polipéptidos de la presente invención pueden incluir otras secuencias de aminoácidos anexadas a la terminal N o C de los péptidos que tienen las secuencias de aminoácidos deducidas expuestas en SEC. ID. NOS: 1-3. Los polipéptidos de la presente invención pueden ser polipéptidos recombinantes, polipéptidos naturales o polipéptidos sintéticos, preferentemente polipéptidos recombinantes. En la presente, "proteína" es sinónimo de "polipéptido".

La presente invención se relaciona asimismo con polipéptidos que comparten por lo menos una identidad de secuencia de por lo menos 60 %, preferentemente por lo menos 70 %, más preferentemente por lo menos 80 %, aun más preferentemente 90 %, más preferentemente aun 95 % o muy preferentemente por lo menos 98 % a lo largo de por lo menos 20, preferentemente por lo menos 30, más preferentemente por lo menos 40, aun más preferentemente por lo menos 50, más preferentemente aun por lo menos 100 o muy preferentemente por lo menos 150 residuos con SEC. ID. NOS: 1-3 (En la presente se puede hacer mención a dichos polipéptidos como "polipéptidos de la presente invención"). En este contexto, se pretende que "una proteína Ryk variante" incluya además los polipéptidos de la presente invención a los que se

hace referencia a este párrafo. En una realización preferida de la presente invención, el polipéptido tiene una longitud de por lo menos 20, preferentemente por lo menos 30, más preferentemente por lo menos 40, más preferentemente aun por lo menos 50 o muy preferentemente por lo menos 100 residuos. En una realización preferida, el péptido de la presente invención tiene una longitud inferior a 600, preferentemente de menos de 550, más preferentemente de menos de 500, aun más preferentemente de menos de 480 residuos. En otra realización preferida, el péptido de la presente invención tiene una longitud inferior a 250, preferentemente de menos de 185, más preferentemente de menos de 150, aun más preferentemente de menos de 99 residuos o muy preferentemente de menos de 60 residuos. La invención contempla asimismo polipéptidos que comparten una identidad de secuencia de por lo menos 60 %, preferentemente por lo menos 70 %, más preferentemente por lo menos 80 %, aun más preferentemente 90 %, o muy preferentemente por lo menos 95 % a lo largo de por lo menos 20, preferentemente por lo menos 30, más preferentemente por lo menos 40, aun más preferentemente por lo menos 50 o muy preferentemente por lo menos 100 residuos con SEC. ID. NOS: 1-3. Los polipéptidos de la presente invención que exhiben ese porcentaje de identidad con las secuencias antes descritas pueden ser analizados para comprobar la actividad biológica de acuerdo con lo descrito en la presente, utilizando un análisis en matriz MATRIGEL, según lo descrito en la presente, o utilizando otros análisis conocidos en la técnica destinados a medir la actividad en la regulación de la angiogénesis. El proceso de medición de la actividad biológica está dentro del alcance de los expertos en la técnica, dada la presente descripción. La modulación de la angiogénesis incluye procesos que dan como resultado la regulación en aumento o decrecimiento de los procesos angiogénicos.

Ese polipéptido antes descrito puede ser (i) un polipéptido en el cual uno o más de los residuos aminoácidos están sustituidos (en comparación con las SEC. ID. NOS: 1.3) con un residuo aminoácido conservado o no conservado (preferentemente un residuo aminoácido conservado) y dicho residuo aminoácido sustituido puede o no ser codificado por el código genético o (ii) aquél en el cual uno o más de los residuos aminoácidos incluyen un grupo sustituyente o (iii) un polipéptido en el cual el polipéptido maduro está fusionado con otro compuesto, como ser un compuesto para aumentar la vida media del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol) o (iv) un polipéptido en el cual otros aminoácidos están fusionados al polipéptido maduro, como ser una secuencia guía o secretoria o una secuencia empleada para la purificación del polipéptido maduro o una secuencia proproteica o una secuencia de proteína madura más allá del dominio extracelular de Ryk o (v) un polipéptido en el cual uno o más aminoácidos es suprimido o insertado en la secuencia del polipéptido. Las combinaciones de los tipos antes descritos de variaciones en la secuencia peptídica están dentro del alcance de la presente invención. Tales polipéptido se consideran dentro del alcance de las personas capacitadas en la técnica a partir de los preceptos aquí expuestos.

Un polipéptido de la presente invención puede contener aminoácidos que no sean los 20 aminoácidos genéticamente codificados. Los polipéptidos pueden ser modificados por procesos naturales, tales como procesamiento postraduccion, o por técnicas de modificación química que son muy conocidas en la técnica. Tales modificaciones han sido adecuadamente descritas en los textos básicos y en monografías más detalladas, así como en una voluminosa literatura de investigación. Las modificaciones se pueden producir en cualquier lugar de la molécula, incluyendo la columna vertebral peptídica, las cadenas laterales de aminoácidos y los términos amino o carboxilo. Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo o diversos grados en varios sitios

de un determinado polipéptido. Además, un polipéptido dado puede contener numerosos tipos de modificaciones. Los polipéptidos pueden ser ramificados, por ejemplo como resultado de la ubiquitinación, o pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Se pueden producir polipéptidos cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados como resultado de los procesos naturales postraducción, o se los puede preparar por métodos sintéticos. Las modificaciones incluyen la acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de una porción hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado nucleotídico, unión covalente de un lípido o derivado lipídico, unión covalente de fosfatidilinositol, entrecruzamiento, ciclación, formación de puentes de disulfuro, desmetilación, formación de entrecruzamientos covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gama-carboxilación, glucosilación, formación de anclajes de GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición de aminoácidos mediada por ARN de transferencia a proteínas, tales como arginilación y ubiquitinación.

Los polipéptidos y polinucleótidos de la presente invención se presentan preferentemente en forma aislada y preferentemente son purificados hasta la homogeneidad. El término "aislado" significa que el material está separado de su medio original (por ejemplo, el ámbito natural si es de origen natural). Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido de origen natural presente en un animal vivo no está aislado, pero el mismo polinucleótido o polipéptido, separado de parte o de todos los materiales coexistentes en el sistema natural, está aislado. Dicho polinucleótido podría ser parte de un vector y/o dicho polinucleótido o polipéptido podría ser parte de una composición y de todas maneras ser aislado por el hecho de que dicho vector o composición no es parte de su ámbito natural.

Como se conoce en la técnica, la "similitud" entre dos polipéptidos se determina comparando la secuencia de aminoácidos y sus sustitutos aminoácidos conservados de un polipéptido con la secuencia de un segundo polipéptido. Dichas sustituciones conservadoras incluyen las descritas por Dayhoff, The Atlas of Protein Sequence and Structure 5 (1978) y por Argos, EMBO J. 8: 779-785 (1989). Por ejemplo, los aminoácidos que pertenecen a uno de los siguientes grupos representan cambios conservadores:

- ala, pro, glu, gln, asn, ser, thr;
- cys, ser, tyr, thr;
- val, ile, leu, met, ala, phe;
- lys, arg, his;
- phe, tyr, trp, his y
- asp, glu.

(Nótese que estas agrupaciones son ejemplos, ya que otras agrupaciones pueden representar opciones más pertinentes).

El término "similitud" o "identidad" se refiere a conservación de secuencias u "homología", entre uno o más péptidos de dos o más moléculas de ácido nucleico, normalmente expresado en términos de porcentajes. Cuando una posición de las secuencias comparadas está ocupada por la misma base o aminoácido ("residuo"), luego las moléculas son idénticas en esa posición. Cuando una posición de dos secuencias peptídicas comparadas está ocupada por un aminoácido con propiedades físicas similares (una sustitución conservadora según lo determinado por una determinada matriz de clasificación; la similitud depende así de la matriz de clasificación elegida), luego las moléculas son similares en esa posición. El porcentaje de identidad o similitud puede ser maximizado alineando las secuencias comparadas una a lo largo de la otra, corriéndolas hacia delante o hacia atrás e introduciendo conservadoramente

brechas en las secuencias, en caso de ser necesario. El porcentaje de identidad se calcula contando el número de residuos idénticos alineados, dividiendo por la longitud total de la región alineada, incluso las brechas de ambas secuencias y multiplicando por 100. De esa forma, la identidad se expresaría, por ejemplo, como "identidad de 60 % a lo largo de 200 aminoácidos" o "57 % de identidad a lo largo de 250 aminoácidos". Por otro lado, tales secuencias serían descritas como "60 % idénticas a lo largo de 200 aminoácidos" o "57 % idénticas a lo largo de 250 aminoácidos", respectivamente. La similitud se calcula contando tanto las identidades como similitudes en el cálculo precedente. Por ejemplo, la alineación expuesta a continuación tiene una identidad de secuencia de 37,5 % a lo largo de 56 aminoácidos ((21 identidades/56 residuos)X100 %), donde 56 es la longitud total de la región alineada. En la presente, los términos "porcentaje de identidad" y "porcentaje de identidad de secuencia" son intercambiables.

RTPSDKPVAK--VANFQLQWLNRRANALLANGVE-RDNQLVV--EGLYTIYSQVLF	56 resid.
	21 ident.
RAPFKKSWAYLQVAKHKLSTW-NK--DGIL-HGVRYQDGNLVIQFPGLYFIICQLQF	56 resid.

La primera secuencia es SEC. ID. NO: 11; la segunda secuencia es SEC. ID. NO: 12

Como ejemplo adicional, la misma alineación expuesta a continuación tiene 55,4 % de similitud de secuencia a lo largo de 56 aminoácidos ((31 similitudes/56 residuos)X100 %), donde 56 es el largo total de la región alineada. En este ejemplo, las sustituciones conservadoras están indicadas por un signo más y las similitudes totales están dadas por la suma de las identidades y las sustituciones conservadoras. (Como se indicara anteriormente, la determinación de las sustituciones conservadoras depende de la matriz clasificadora elegida. La misma alineación expuesta a continuación puede dar un valor diferente para el porcentaje de similitud utilizando otra matriz de clasificación).

RTPSDKPVAM--VANPQLQWLNRRANALLANGVE-RDNQLVVE- GLYLIYSQVLF 56 resid.
 R P K A+ VA +L W N+ + +L +GV +D LV+- GLY I Q+ F 31 simil.
 RAPFKKSWAYLQVAKHKLSW-NK--DGIL-HGVRYQDGNLVIQFPGLYFIICQLQF 56 resid.
 La primera secuencia es SEC. ID. NO: 11; la segunda secuencia es SEC. ID. NO: 12

Ambas secuencias en la región alineada pueden estar contenidas dentro de secuencia más largas, posiblemente menos homólogas. Las secuencias "no relacionadas" o "no homólogas" típicamente comparten menos de 40 % de identidad en el nivel peptídico, preferentemente menos de 25 % de identidad.

La invención abarca además polinucleótidos que codifican para los polipéptidos antes descritos de la presente invención. Estos polinucleótidos pueden estar en la forma de ARN o en forma de ADN, ADN que incluye ADNc, ADN genómico y ADN sintético. El ADN puede ser de doble cadena o de cadena simple. Los polinucleótidos pueden incluir sólo la secuencia codificadora para el polipéptido maduro, la secuencia codificadora para el polipéptido maduro y otras secuencias codificadoras tales como una secuencia guía o secretoria o una secuencia proproteica; la secuencia codificadora para el polipéptido maduro (y, optativamente, otra secuencia codificadora) y una secuencia no codificadora, tales como intrones o secuencia no codificadora 5' y/o 3' con respecto a la secuencia codificadora para el polipéptido maduro. Por consiguiente, el término "polinucleótido que codifica un polipéptido" abarca un polinucleótido que incluye sólo la secuencia codificadora para el polipéptido, así como un polinucleótido que incluye otra secuencia codificadora o no codificadora.

La presente invención se relaciona asimismo con variantes de los polinucleótidos descritos en este documento. Las variantes de los polinucleótidos pueden ser variantes alélicas de origen natural de los polinucleótidos o variantes de los polinucleótidos de origen no natural. Como es de conocimiento en la técnica, una variante alélica es una forma alternativa de una secuencia polinucleotídica que puede tener una sustitución, delección o adición de uno o más

nucleótidos, que no altera sustancialmente la función de los polipéptidos codificados. Por consiguiente, la presente invención incluye polinucleótidos que codifican los mismos polipéptidos maduros descritos en el Ejemplo 1, más adelante, así como variantes de tales polinucleótidos, variantes que incluyen variantes por delección, variantes por sustitución y variantes por adición o inserción.

La presente invención incluye asimismo polinucleótidos en los cuales la secuencia codificadora para los polipéptidos maduros puede estar fusionada a una secuencia de polinucleótidos que contribuye a la expresión y secreción de un polipéptido de una célula huésped, por ejemplo una secuencia guía que funciona como secuencia secretoria para controlar el transporte de un polipéptido desde una célula. El polipéptido que tiene una secuencia guía es una preproteína y su secuencia guía puede ser escindida por la célula huésped para formar la forma madura del polipéptido. Los polinucleótidos también pueden codificar para una proproteína que es la proteína madura más otros residuos aminoácidos adicionales. Una proteína madura que tiene una prosequencia es una proproteína y es una forma inactiva de la proteína. Una vez que la prosequencia se escinde, queda una proteína madura activa. Por ejemplo, los polinucleótidos de la presente invención pueden codificar para una proteína madura o para una proteína que tiene una prosequencia o para una proteína que tiene tanto una prosequencia como una presequencia (secuencia guía).

Los polinucleótidos de la presente invención pueden tener además su secuencia codificadora fusionada en marco a una secuencia marcadora que da lugar a la purificación del polipéptido de la presente invención. La secuencia marcadora puede ser, por ejemplo, un marcador de hexa-histidina provisto por un vector pQE-9 para dar lugar a la purificación del polipéptido maduro fusionado al marcador en el caso de un huésped bacteriano o, por ejemplo, la secuencia

marcadora puede ser un marcador de hemaglutinina (HA) cuando se utiliza una célula de mamífero, por ejemplo células COS-7. El marcador HA corresponde a un epítoto derivado de la proteína hemaglutinina de influenza. Wilson y otros, 1984, Cell 37: 767. Otros sistemas marcadores son conocidos en la técnica, incluyendo el marcador FLAG. El marcador FLAG se basa en el octapéptido marcador GLAG (N-ASpTyrLysAspAspAspLys-C) (SEC. ID. NO: 13). La secuencia FLAG es hidrófila y los últimos 5 aminoácidos (AspAspAspLys) (subsecuencia de SEC. ID. NO: 13) representan la secuencia diana de la proteasa enterocinasa.

El término "gen" significa el segmento de ADN implicado en la producción de una cadena polipeptídica; incluye las regiones anterior y siguiente a la región codificadora (guía y de arrastre), así como las secuencias interpuestas (intrones) entre los segmentos codificadores individuales (exones). Se pueden utilizar fragmentos de un gen como sonda de hibridación para una genoteca de ADNc, a fin de aislar el gen total y para aislar otros genes que tienen una elevada similitud de secuencias con el gen o que tienen actividad biológica similar. Las sondas de este tipo tienen típicamente por lo menos 20 bases y preferentemente tienen por lo menos 30 bases y pueden contener, por ejemplo, 50 o más bases. La sonda puede ser utilizada asimismo para identificar un clon de ADNc correspondiente a un transcripto de longitud total y un clon genómico, o clones que contienen el gen completo, incluso las regiones regulatorias y promotoras, exones e intrones. Un ejemplo de análisis de rastreo comprende aislar la región codificadora de un gen utilizando la secuencia de ADN conocida para sintetizar una sonda de oligonucleótidos. Los oligonucleótidos marcados que tienen una secuencia complementaria de la del gen se utilizan para rastrear una genoteca de ADNc, ADN genómico o ARNm humano a fin de determinar a qué miembros de la genoteca se hibrida la sonda.

La presente invención se refiere a polinucleótidos con por lo menos 70 % de identidad, preferentemente por lo menos 80 % de identidad, más preferentemente por lo menos 90 % de identidad, aun más preferentemente por lo menos 95 % de identidad y muy preferentemente 98 % de identidad con un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención, así como fragmentos del mismo, fragmentos que tienen por lo menos 20 bases y que preferentemente tienen por lo menos 30 bases y más preferentemente tienen por lo menos 50 bases, así como a los polipéptidos codificados por dichos polinucleótidos. Una realización preferida está dada por polinucleótidos que tienen por lo menos 70 % de identidad, preferentemente por lo menos 80 % de identidad, más preferentemente por lo menos 90 % de identidad, aun más preferentemente por lo menos 95 % de identidad y muy preferentemente 98 % de identidad con un polinucleótido que codifica los polipéptidos que tienen las secuencias expuestas en SEC. ID. NOS: 1-3. Tales polinucleótidos pueden estar contenidos dentro de secuencias nucleotídicas de mayor tamaño, como en las realizaciones de la presente invención representadas por SEC. ID. NOS: 17-20. En las realizaciones preferidas, la presente invención se refiere a polinucleótidos que tienen menos de 1500, preferentemente menos de 1000, más preferentemente menos de 600, aun más preferentemente menos de 200, más preferentemente todavía menos de 100 y muy preferentemente menos de 35 bases de longitud.

La presente invención se refiere asimismo a vectores que incluyen los polinucleótidos de la presente invención antes descriptos, a las células huésped que están genéticamente modificadas con vectores de la presente invención y a la producción de los polipéptidos de la presente invención por técnicas recombinantes. Las células huésped pueden ser genéticamente manipuladas (traducidas o transformadas o transfectadas) con los vectores de la presente invención que pueden consistir, por ejemplo, en un vector de clonación o un

vector de expresión. El vector puede estar, por ejemplo, en la forma de un plásmido, una partícula viral, un fago, etc. Las células huésped modificadas pueden ser cultivadas en medios nutrientes convencionales modificados según lo indicado para activar promotores, seleccionar transformantes o amplificar el gen para el polipéptido de la presente invención. Las condiciones de cultivo, como la temperatura, el pH y demás, son las utilizadas anteriormente con la célula huésped seleccionada para la expresión y son obvias para la persona normalmente capacitada en la técnica. El polinucleótido de la presente invención puede ser empleado para producir un polipéptido por técnicas recombinantes.

Así, por ejemplo, la secuencia polinucleotídica puede estar incluida en cualquiera de una variedad de vehículos de expresión, en especial vectores o plásmidos para la expresión de un polipéptido. Tales vectores incluyen secuencias de ADN cromosómico, no cromosómico y sintético, por ejemplo derivados de SV40; plásmidos bacterianos, ADN fago, plásmidos de levadura, vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN fago, ADN viral tal como vaccinia, adenovirus, el virus de la varicela y la pseudorrabia. Sin embargo, se puede utilizar cualquier otro vector o plásmido siempre que se pueda replicar y sea viable en el huésped.

La secuencia de ADN apropiada puede ser insertada en el vector mediante una variedad de procedimientos. Tales procedimientos y otros se consideran incluidos dentro del alcance de los expertos en la técnica. La secuencia de ADN del vector de expresión está operativamente ligada a una o más secuencias para control de expresión (promotoras) para dirigir la síntesis de ARNm. Como ejemplos representativos de tales promotores, se pueden mencionar el promotor LTR o SV40, el promotor de E. coli. lac o trp, el fago lambda PL y otros promotores conocidos por su control de la expresión de genes en células procarióticas o eucarióticas o sus virus. El vector de expresión puede contener

asimismo un sitio de unión de ribosomas para la iniciación de la traducción y un terminador de la transcripción. El vector puede incluir además secuencias apropiadas para amplificar la expresión. Además, los vectores de expresión contienen preferentemente un gen para producir un rasgo fenotípico para la selección de células huésped transformadas tales como resistencia a dihidrofolato reductasa o a la neomicina para el cultivo de células eucarióticas o como de resistencia a la tetraciclina o ampicilina en *E. coli*. El vector que contiene la secuencia de ADN apropiada descrita anteriormente, así como un promotor o secuencia control apropiada, puede ser empleado para transformar un huésped apropiado a fin de permitir que el huésped exprese la proteína. Como ejemplos representativos de huéspedes adecuados, se pueden mencionar las células bacterianas tales como *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Streptomyces*; células fúngicas tales como levadura, células de insectos tales como *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9, células animales tales como CHO, COS o melanoma de Bowes, células vegetales, etc. La selección de un huésped apropiado se considera al alcance de los expertos en la técnica a partir de los preceptos aquí presentados.

La presente invención incluye asimismo construcciones recombinantes que comprenden una o más de las secuencias descritas anteriormente en forma general. Las construcciones comprenden un vector, como ser un plásmido o vector viral, en el cual se ha insertado una secuencia de la presente invención, en una orientación adelantada o inversa. En un aspecto preferido de la presente invención, la construcción comprende además secuencias reguladoras que incluyen por ejemplo, un promotor, operativamente ligado a la secuencia. Los expertos en la técnica conocen grandes números de vectores y promotores adecuados, y éstos pueden ser adquiridos en el comercio. A manera de ejemplo se presentan los siguientes vectores. Bacterianos: pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen), pBS, phagescript, psiX174, pBluescript SK, pBsKs, pNH8a, pNH16a,

pNH18a, pNH46a (Stratagene), pTRC99A, pKK223-3, pDR540, PRIT4 (Pharmacia). Eucarióticas: pWLneo, pSV2cat, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG.. PSVL (Pharmacia). Sin embargo, se puede utilizar cualquier otro plásmido o vector siempre que sea viable o se lo pueda hacer viable en el huésped. Las regiones promotoras pueden ser seleccionadas entre cualquier gen deseado utilizando vectores CAT (cloranfenicol acetiltransferasa) u otros vectores con marcadores seleccionables. Dos vectores apropiados son pKK232-8 y pCM7. Entre los promotores bacterianos específicos nombrados se incluyen lacI, lacZ, T3, T7, gpt, lambda PR, PL y trp. Los promotores eucarióticos incluyen CMV intermedio precoz, HSV timidina cinasa y SVr0 tardío, LTRs de retrovirus y metalotioneína-1 de ratón. La selección del vector y promotor apropiado es absolutamente de competencia de la persona normalmente capacitada en la técnica.

La presente invención se relaciona asimismo con células huésped que contienen la construcción antes mencionada. La célula huésped puede ser una célula eucariótica superior como una célula de mamífero, o una célula eucariótica inferior como una célula de levadura, o bien la célula huésped puede ser una célula procariótica como una célula bacteriana. La introducción de la construcción en la célula huésped se puede efectuar por transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-Dextrano o electroporación. Las construcciones en células huésped se pueden utilizar de modo convencional para producir el producto génico codificado por la secuencia recombinante. Por otro lado, los polipéptidos de la presente invención pueden ser producidos sintéticamente por sintetizadores peptídicos convencionales.

Las proteínas maduras pueden ser expresadas en células de mamíferos, levadura, bacterias u otra células bajo el control de promotores apropiados. También se pueden emplear sistemas de traducción libres de células para

producir tales proteínas empleando ARNs derivados de construcciones de ADN de la presente invención. Los vectores de clonación y expresión apropiados para usar con huéspedes procarióticos y eucarióticos han sido descritos por Sambrook y otros (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; cuyo texto se incorpora a la presente como referencia).

La transcripción de un ADN que codifica los polipéptidos de la presente invención por eucariotas superiores se incrementa mediante la inserción de una secuencia intensificadora en el vector. Los intensificadores son elementos de ADN que actúan en cis, habitualmente de aproximadamente 10 a 300 pb, que actúan sobre un promotor aumentando la transcripción. Entre los ejemplos se incluye el intensificador SV40 del lado tardío del origen de réplica (pb 100 a 270), un intensificador promotor temprano de citomegalovirus, un intensificador de polioma del lado tardío del origen de réplica e intensificadores de adenovirus. Generalmente, los vectores de expresión recombinantes incluyen orígenes de réplica y marcadores seleccionables que permiten la transformación de la célula huésped, por ejemplo el gen de resistencia a la ampicilina de *E. coli* y el gen TRP1 de *S. cerevisiae* y un promotor derivado de un gen altamente expresada para dirigir la transcripción de una secuencia estructural en línea de salida. Tales promotores pueden ser derivados de operones que codifican enzimas glucolíticas tales como 3-fosfoglicerato cinasa (PGK), factor alfa, fosfatasa ácida o proteínas termosensibles, entre otros. La secuencia estructural heteróloga se ensambla en la fase apropiada con secuencias iniciación y terminación de traducción y preferentemente, una secuencia guía con capacidad para dirigir la secreción de la proteína traducida hacia el espacio periplásmico o medio extracelular. Optativamente, la secuencia heteróloga puede codificar una proteína de fusión que incluye un péptido de identificación N-terminal que imparte las características

ventajosas, por ejemplo estabilización o purificación simplificada del producto recombinante expresado.

Los vectores de expresión útiles para uso bacteriano se construyen insertando una secuencia de ADN estructural que codifica una proteína buscada junto con señales de traducción, iniciación y terminación adecuadas en fase de lectura operable con un promotor funcional. El vector comprende uno o más marcadores seleccionables fenotípicos y un origen de réplica para garantizar el mantenimiento del vector y, si se desea, producir la amplificación dentro del huésped. Los huéspedes procarióticos adecuados para la transformación incluyen *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* y diversas especies dentro de los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Staphylococcus*, si bien se pueden emplear otros como elección. Los vectores de expresión ventajosos para uso bacteriano pueden comprender un marcador seleccionable y un origen de réplica bacteriano derivado de los plásmidos comercialmente disponibles que comprenden elementos genéticos del conocido vector de clonación pBR322 (ATCC 37017). Entre dichos vectores comerciales se incluye, por ejemplo, pKK223-3 (Pharmacia fine Chemicals, Uppsala, Suecia) y GEM1 (Promega Biotec, Madison, WI). Estas secciones pBR322 de "columna vertebral" se combinan con un promotor apropiado y la secuencia estructural a expresar.

Tras la transformación de una cepa huésped adecuada y el desarrollo de la cepa huésped a una densidad celular apropiada, se puede desreprimir al promotor seleccionado, si es necesario, por medios apropiados (por ejemplo, cambio de temperatura o inducción química) y se puede cultivar a las células durante un período adicional. Las células son típicamente cosechadas por centrifugación, rotas por medios físicos o químicos y el extracto crudo así producido es retenido para su posterior purificación. Las células microbianas empleadas en la expresión de proteínas pueden ser desestabilizadas por

cualquier método conveniente, incluso ciclos de congelación-descongelación, ultrasonido, desestabilización mecánica o el uso de agentes de lisis celular.

También se pueden emplear diversos sistemas de cultivo celular de mamíferos para expresar la proteína recombinante. Entre los ejemplos de sistemas de expresión en mamíferos se cuentan las líneas COS-7 de fibroblastos de riñón de mono (82) y otras líneas celulares capaces de expresar proteínas a partir de un vector compatible, por ejemplo, las líneas celulares C127, 3T3, CHO, HeLa y BHK. Los vectores de expresión en mamíferos generalmente comprenden un origen de réplica, un promotor e intensificador adecuado, así como también cualquier sitio de unión ribosómica necesario, sitio de poliadenilación, sitios donadores y aceptores de empalme, secuencias de terminación de la transcripción y secuencias no transcritas flanqueantes en 5'. Se pueden utilizar secuencias de ADN derivadas del genoma viral de SV40, por ejemplo se pueden utilizar los sitios de origen de SV40, promotor temprano, intensificador, empalme y poliadenilación para producir los elementos genéticos no transcritos necesarios.

El polipéptido de la presente invención puede ser recuperado y purificado a partir de cultivos celulares por métodos utilizados hasta el presente, incluyendo precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio de aniones o catiónicos, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxipatita y cromatografía con lectina. Se pueden utilizar pasos de replegamiento de proteínas, en caso de ser necesario, para completar la configuración de la proteína madura. Por último, se puede emplear cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para los pasos de purificación final.

El polipéptido de la presente invención puede ser un producto naturalmente purificado o el producto de procedimientos de síntesis química, o producido por técnicas recombinantes a partir de un huésped procariótico o eucariótico (por

ejemplo, por células bacterianas, de levadura, plantas superiores, insectos y mamíferos en cultivo). Dependiendo del huésped empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos de la presente invención pueden ser glucosilados con carbohidratos de mamífero u otras eucarióticas o pueden ser no glucosilados. Los polipéptidos de la presente invención pueden incluir asimismo un residuo aminoácido metionina inicial.

Los polipéptidos de la presente invención, o los polinucleótidos que codifican para los polipéptidos de la presente invención, pueden ser utilizados en un proceso de terapia génica. Dicha terapia génica puede estar incluida en el tratamiento de una enfermedad o trastorno clínico que puede incluir, aunque sin limitarse, al cáncer, cicatrización de heridas, las retinopatías diabéticas, la degeneración macular, las enfermedades cardiovasculares y los trastornos clínicos que conllevan la angiogénesis en el aparato reproductor, incluyendo la regulación de la vascularización placentaria o uso como abortivo. Por ejemplo, las células pueden ser modificadas con un polinucleótido (ADN o ARN) que codifica para el polipéptido ex vivo, para luego brindarse las células modificadas a un paciente para su tratamiento con el polipéptido. Dichos métodos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células pueden ser modificadas por procedimientos conocidos en la técnica mediante el uso de una partícula retroviral que contiene ARN que codifica para el polipéptido de la presente invención.

Se contemplan tanto metodologías de terapia génica in vitro como in vivo. Se conocen varios métodos para transferir genes potencialmente terapéuticos a poblaciones celulares definidas. Ver, por ejemplo, Mulligan (1993) Science 260: 926-31. Estos métodos incluyen:

1) transferencia directa de genes. Ver, por ejemplo, Wolf y otros (1990) Science 247: 1465-68.

2) transferencia de ADN mediada por liposomas. Ver, por ejemplo, Caplen y otros (1995) *Nature Med.* 3: 39-46, Cristal (1995) *Nature Med.* 1: 15-17, Gao y Huang (1991) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 179: 280-85.

e) transferencia de and mediada por retrovirus. Ver, por ejemplo, Kay y otros (1993) *Science*, 262: 117-19; Anderson (1992) *Science* 256: 808-13. Los retrovirus a partir de los cuales se pueden derivar los vectores plasmídicos retrovirales antes mencionados incluyen, aunque no se limitan al Virus de la Leucemia Murina de Moloney, el virus de la necrosis esplénica, retrovirus tales como el Virus del Sarcoma de Rous, el Virus del Sarcoma de Harvey, el virus de la leucosis aviar, el virus de la leucemia de los simios gibones, el virus de inmunodeficiencia humana, adenovirus, el Virus del Sarcoma mieloproliferativo y el virus de tumores mamarios. En una realización, el vector plasmídico retroviral se deriva del Virus de la Leucemia Murina de Moloney.

4) Transferencia de ADN mediada por ADN virus. Tales virus ADN incluyen adenovirus (preferentemente vectores a base de Ad-2 o Ad-5), virus herpes (preferentemente vectores a base de virus herpes simplex) y parvovirus (preferentemente vectores a base de parvovirus "defectuosos" o no autónomos, más preferentemente vectores a base de virus adeno-asociados, muy preferentemente vectores a base de AAV-2). Ver, por ejemplo, Ali y otros (1994) *Gene Therapy*, 1: 367-84, patente de los Estados Unidos No. 4.797.368, que se incorporan a la presente como referencia, así como la patente de los Estados Unidos No. 5.139.941, que se incorpora a la presente como referencia. Los adenovirus tienen la ventaja de que tienen una amplia gama de huéspedes, pueden infectar células inactivas o terminalmente diferenciadas tales como neuronas o hepatocitos y parecen ser esencialmente no oncogénicas. Los adenovirus no parecen integrarse al genoma del huésped. Dado que existen extracromosómicamente, el riesgo de mutagénesis por inserción se reduce

considerablemente. Los virus adenoasociados exhiben ventajas similares como vectores de base adenoviral. Sin embargo, los AAV exhiben integración de sitio específico en el cromosoma humano 19.

La elección de un sistema vector específico para transferir el gen de interés depende de una variedad de factores. Un factor importante es la naturaleza de la población de células diana. Si bien se han estudiado extensamente los vectores retrovirales y se los ha utilizado en un número de aplicaciones de terapia génica, estos vectores generalmente son incompatibles para la infección de células no divisibles. Además, los retrovirus tienen el potencial de la oncogenicidad. Sin embargo, las recientes innovaciones en el campo de los vectores lentivirales pueden eludir algunas de estas limitaciones. Ver Naldini y otros (1996) *Science* 272: 263-7.

De acuerdo con esta realización, se aplica a un paciente que lo necesita, una terapia génica con ADN que codifica un polipéptido de la presente invención, simultáneamente con el diagnóstico o inmediatamente después del mismo. El especialista capacitado sabrá apreciar que, de acuerdo con esta realización, se puede utilizar cualquier vector de terapia génica adecuado que contenga ADN que codifica un polipéptido de la presente invención. Las técnicas para construir ese tipo de vector son conocidas. Ver, por ejemplo, Anderson (1998) *Nature*, 392 25-30, Verma (1998) *Nature*, 389 239-42. La introducción del vector al sitio diana se puede obtener utilizando técnicas conocidas.

La presente invención se relaciona asimismo con un análisis de diagnóstico para detectar niveles de los polipéptidos de la presente invención, por ejemplo en diversos tejidos, dado que la sobreexpresión de las proteínas, en comparación con muestras de tejidos control normales, puede detectar la presencia de proliferación celular anormal, por ejemplo un tumor. Los ensayos utilizados para detectar niveles de proteínas en una muestra derivada de un huésped son

conocidos por los expertos en la técnica e incluyen radioinmunoensayos, ensayos de unión competitiva, análisis de Western Blot, análisis ELISA y ensayos tipo "sándwich". Los análisis de diagnóstico pueden incluir asimismo la detección de polinucleótidos que codifican para los polipéptidos de la presente invención.

Los polipéptidos de la presente invención se pueden utilizar como inmunógenos para producir anticuerpos contra los mismos. Estos anticuerpos pueden ser, por ejemplo, anticuerpos policlonales o monoclonales. La presente invención incluye además anticuerpos quiméricos, de cadena simple y humanizados, así como fragmentos Fab, o el producto de una genoteca de expresión de Fab. Se pueden utilizar diversos procedimientos conocidos en la técnica para la producción de dichos anticuerpos y fragmentos.

Los anticuerpos generados contra los polipéptidos de la presente invención están incluidos en la presente invención. "Anticuerpo", incluye, en este contexto, moléculas intactas de inmunoglobulina (por ejemplo IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2b, IgG3, IgM, IgD, IgE, IgA), así como fragmentos de las mismas tales como Fab, F(ab')₂, scFv y Fv, que tienen capacidad para unirse específicamente a un epítipo de una proteína Ryk variante. De preferencia, los anticuerpos que se ligan específicamente a Ryk variante no detectan otras proteínas en estudios inmunoquímicos. Además, los anticuerpos preferibles para esta invención son anticuerpos humanos.

Más específicamente, los anticuerpos humanos de la presente invención se ligan específicamente a la proteína Ryk variante humana con una K_d de aproximadamente 0,1 nM a aproximadamente 10 μ M, de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 1 μ M, de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 200 nM, de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 150 nM o de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 100 nM. Los anticuerpos humanos más preferidos se unen específicamente a Ryk variante con una K_d seleccionada

entre el grupo que consiste en aproximadamente 2 nM, aproximadamente 7 nM, aproximadamente 10 nM y aproximadamente 11 nM. Las K_d preferidas están en el rango de aproximadamente 1 nM, aproximadamente 3 nM, aproximadamente 9 nM, aproximadamente 13 nM, aproximadamente 14 nM, a aproximadamente 15 nM. La K_d de anticuerpo humano unido a Ryk variante puede ser analizada utilizando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo tecnologías tales como el Análisis de Interacción Bimolecular (BIA) (Sjolander & Urbaniczky, *Anal. Chem.* 63, 2338-2345, 1991 y Szabo y otros, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5, 699-705, 1995). BIA es una tecnología para el estudio de interacciones bioespecíficas en tiempo real, sin la marcación de ninguno de los interactuantes (por ejemplo, BIAcore (denominación comercial)). Se pueden utilizar cambios en la resonancia plasmónica superficial de fenómenos ópticos (SPR) como indicación de reacciones en tiempo real entre moléculas biológicas.

Los anticuerpos generados contra los polipéptidos de la presente invención pueden ser obtenidos de diversas maneras. Por ejemplo, los anticuerpos por inyección directa de los polipéptidos en un animal o por administración de los polipéptidos a un animal, preferentemente no un ser humano. A continuación, el anticuerpo así obtenido se une al polipéptido mismo. De esta manera, se puede utilizar incluso una secuencia que codifica sólo un fragmento de los polipéptidos para generar anticuerpos que se unen a los polipéptidos nativos enteros. Luego se pueden utilizar dichos anticuerpos para aislar al polipéptido del tejido que expresa ese polipéptido o como reactivo de diagnóstico.

Para la preparación de anticuerpos monoclonales, se puede utilizar cualquier técnica que dé origen a anticuerpos producidos por cultivos continuos de líneas celulares. Ver, en general, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Lane, Edit. (1988), Cold Spring Harbor Laboratory. Entre los ejemplos se cuentan la técnica del hibridoma (Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256: 495-97), la técnica

del trioma, la técnica de hibridoma de células B humanas (Kozbor y otros (1983) *Immunology today*, 4:72) y la técnica de hibridoma de EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole y otros (1985) en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pág. 77-96).

Las técnicas descriptas para la producción de anticuerpos de cadena simple (patente de los Estados Unidos No. 4.946.778) pueden ser adaptadas para producir anticuerpos de cadena simple contra los polipéptidos inmunogénicos producidos por la presente invención. Además, se pueden utilizar ratones transgénicos para expresar anticuerpos humanizados contra los productos polipéptidos inmunogénicos de la presente invención. También se pueden producir anticuerpos humanizados por los métodos descriptos en las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.530.101; 5.585.089, 5.693.761 y 5.693.762, que se incorporan a la presente como referencia.

Los anticuerpos humanos con las características de unión de la Ryk variante antes descriptas pueden ser identificadas a partir de la genoteca HuCAL MorphoSys de la siguiente manera. Se aplica la proteína Ryk variante humana sobre una placa microtituladora y se la incuba con la genoteca de fagos MorphoSys HuCAL (ver Ejemplo 8, a continuación). Se pueden lavar y eliminar de la placa los Fabs ligados a fagos que no se unen a la Ryk variante, dejando sólo el fago que se une fijamente a la Ryk variante. Se puede eluir el fago unido mediante el cambio de pH y amplificarlo mediante infección de huéspedes de *E. coli*. Este proceso en cubetas se puede repetir una o dos veces para el enriquecimiento con una población de anticuerpos que se unen estrechamente a la Ryk variante. Seguidamente, los Fabs del grupo enriquecido son expresados, purificados y rastreados en un ensayo ELISA. Los aciertos identificados son clasificados luego en el ensayo enzimático descripto en las obras de Bickett y otros, 1993 y Boden y otros, 1994.

En los ejemplos específicos expuestos a continuación se describen detalles del proceso de rastreo ("screening"). Los expertos en la técnica podrán contemplar otros métodos de selección para anticuerpos específicos sumamente activos o fragmentos de anticuerpos, métodos que pueden ser utilizados para identificar anticuerpos TIMP-1 humanos.

Los anticuerpos humanos con las características antes descritas pueden ser purificados asimismo de cualquier célula que exprese los anticuerpos utilizando métodos conocidos por los técnicos capacitados y que han sido descritos con respecto a la purificación de una proteína. Más aun, se pueden producir anticuerpos humanos utilizando métodos químicos para sintetizar su secuencia de aminoácidos, una vez más, utilizando técnicas muy conocidas por los expertos en la técnica y descritas anteriormente con respecto a la purificación de una proteína.

REALIZACIONES ESPECÍFICAS

EJEMPLO 1

Expresión de la proteína de fusión Ryk-Fc: El ADNc correspondiente al dominio extracelular de Ryk según lo descrito por Halford (SEC. ID. NO: 2) fue fusionado en su extremo 3' al ADNc que codifica al marcador Fc (SEC. ID. NO: 4) y en su extremo 5' con el ADNc que codifica la secuencia del péptido señal (SEC. ID. NO: 5). El gen de fusión resultante (secuencia polinucleotídica dada en SEC. ID. NO: 16) fue clonado en un vector que contenía un promotor hCMV para impulsar la expresión génica y el gen de resistencia a la ampicilina para la selección, y la proteína fue expresada en células hEK293E (Invitrogen, Carlsbad, CA). La proteína de fusión Ryk-Fc con la secuencia dada por SEC. ID. NO: 8 (que carece de la secuencia peptídica señal, que es eliminada por las células durante el procesamiento durante la secreción) fue purificada a partir del medio acondicionado mediante una purificación de un solo paso utilizando una resina de

afinidad Protein-A-Sepharose. La elución de la proteína de fusión Ryk-Fc de la resina de afinidad se llevó a cabo con glicina 0,2 M, pH 2,8. El producto eluido fue neutralizado de inmediato con bicarbonato de sodio saturado a pH 7,5-8,0 y dializado en salina con buffer de fosfato con membrana de diálisis (corte a 6.000 dalton) durante la noche a 5°C. El análisis analítico de la proteína de fusión purificada Ryk-Fc por análisis de SDS-PAGE y transferencia Western con anticuerpos anti-Fc indicaron la presencia de dos componentes, uno a la masa molecular estimada del monómero (~60 kDa) y otra a la masa prevista para el dímero (~120 kDa).

Expresión de la proteína de fusión Ryk-myc-His: Se preparó esta proteína Ryk variante descrita por SEC. ID. NO: 9 en un sistema de expresión adenoviral. Se fusionó un ADNc correspondiente al dominio extracelular de Ryk de acuerdo con lo descrito por Tamagnone (SEC. ID. NO: 1) a ADNc correspondientes a un péptido de secuencia señal (SEC. ID. NO: 5) y una secuencia myc-(6X)His (SEC. ID. NO: 21). El ADNc resultante, descrito por SEC. ID. NO: 17, fue clonado en los sitios BglIII-HindIII de un transportador de CMV. (He y otros 81998) Proc Natl Acad Sci USA. 95: 2509-14). Este plásmido se conoce como RYK-myc-his6 pShuttleCMV. Se cultivaron células 293A (Quantum Biotechnologies) en una placa de 6 receptáculos en DMEM+10 % de FBS. Una vez que las células hubieron llegado a la confluencia, se las enjuagó dos veces con medio de suero reducido OPTI-MEM 1 (Life Technologies, Gaithersburg, MD) y se las incubó con una solución de transfección LIPOFECTAMINE. La solución de transfección fue producida de acuerdo con la información del proveedor (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). En síntesis, se diluyeron 3 µg de ADN de RYK-myc-his6-pShuttleCMV en 0,25 ml de medio de suero reducido OPTIMEM 1 y se los mezcló con 30 µl de solución de transfección LIPOFECTAMINE que había sido diluida en 0,25 ml de medio de suero reducido. OPTIMEM 1. La mezcla fue agregada a las células e

incubada durante 4,5 horas. Se agregó DMEM + 10 %FBS y se incubó durante la noche. Al día siguiente se cambió el medio por DMEM FBS 10%. Al cabo de 24 horas más se cambió el medio por medio de suero reducido OPTIMEM 1. También se incubaron células 293A que no habían sido transfectadas en medio de suero reducido OPTI-MEM 1 para que sirvan como controles en los ensayos subsiguientes. Se recogió el sobrenadante después de 48 horas de incubación.

EJEMPLO 2

Un método para evaluar los mecanismos angiogénicos conlleva el uso de un ensayo in vitro identificado como el ensayo de matriz HUVEC MATRIGEL. Este ensayo imita la organización capilar de las células endoteliales y es un ensayo in vitro standard utilizado para evaluar los mecanismos angiogénicos.

En general, se sembraron células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC, de ATCC, Manassas, VA) a razón de 3×10^4 células por receptáculo en medio completo HUVEC. El medio completo HUVEC contenía medio F12K con L-glutamina 2 mM, 100 ug/ml de Heparina, 50 ug/ml de suplemento para desarrollo de células endoteliales (ECGS) y 10 % de suero fetal bovino (FBS). Se sembraron células endoteliales de pulmón murino (MLuEC) a razón de 5×10^4 células por receptáculo en un medio completo que contenía DMEM con L-glutamina 2 mM, 1 % de Pen/Strep y 10 % de FBS. Se preparó una matriz de membrana basal MATRIGEL (Becton Dickinson, Franklin Lanes, NJ) utilizando pipetas, varillas, placas y tubos previamente enfriados durante la manipulación de la matriz. La matriz fue descongelada a 4°C durante la noche en hielo, utilizada para revestir una placa de 24 receptáculos (Costar, VWR, West Chester, PA) a razón de 0,3 ml/receptáculo, y luego polimerizada a 37°C por espacio de 2 horas. Se agregaron muestras de ensayo en 0,5 ml de medio completo por receptáculo y se agregaron células HUVEC o MLuEC en 0,5 ml de medio por receptáculo, de manera que el volumen total de medio por receptáculo fuera de 1,0 ml. Los

experimentos se llevaron a cabo por triplicado, con concentración proteica variada (desde 2,5 fM a 250 nM con incrementos logarítmicos o de una dilución 1:4 a 1:4000 del sobrenadante con contenido de proteína Ryk variante. Las células fueron incubadas durante la noche a 37°C, CO₂ al 5 %, luego fijadas y coloreadas utilizando un equipo de tinción DIC-QUIK (VWR, West Chester, PA). Las placas fueron sumergidas en Solución Fijadora (Fixative Solution) por espacio de 5 segundos, en la Solución 1 durante 5 segundos y en la Solución 2 durante 5 segundos, luego enjuagadas con agua desionizada y puestas a secar. A continuación, las placas fueron examinadas bajo el microscopio invertido y se realizó el análisis cuantitativo de las estructuras de tipo capilar. En el presente contexto, la expresión "estructuras de tipo capilar" se refiere a las estructuras organizativas que son producto del comportamiento de las células endoteliales in vitro en una matriz MATRIGEL. El término "estructuras de tipo capilar" puede incluir también células organizadas in vivo o in vitro, llevando al a angiogénesis y participando en la misma, lo que produce el efecto de que las células se asocien entre sí y formen capilares.

Se evaluó el efecto de una proteína Ryk variante utilizando el ensayo in vitro con HUVEC Matrigel. Específicamente, se agregó Ryk-Fc en diferentes concentraciones a HUVEC desarrolladas en cultivo en una matriz MATRIGEL. Veinticuatro horas más tarde, las células fueron fijadas y evaluadas para determinar la organización de tipo capilar. La medición de la organización de tipo capilar en cada receptáculo permite el análisis cuantitativo del efecto biológico de los compuestos analizados.

En cuatro experimentos separados, se ha demostrado que Ryk-Fc inhibe considerablemente la organización de tipo capilar en HUVEC (Figura 4A) o MLuEC (Figura 4B). Los resultados de los experimentos representativos están consignados en la Figura 4. En estos experimentos, se preparó Ryk-Fc de

acuerdo con lo descrito en el Ejemplo 1 y luego se la agregó a las células en diversas concentraciones desde 2,5 fM a 250 nM con incrementos logarítmicos. Los resultados exhibidos en las Figuras 4A y 4B demuestran que Ryk-Fc inhibe la organización de tipo capilar en forma dependiente de la dosis. En estos experimentos, IL-8-TVR, se adicionó una muteína de IL-8 que ha demostrado tener efecto inhibitorio en este ensayo, en una concentración de 250 nM. IL-8-TVR tiene los dos aminoácidos Glu-Leu sustituidos por los dos aminoácidos Thr-Val, respectivamente que se encuentran en las posiciones 3 y 4 de la secuencia de aminoácidos de la proteína IL-8 de tipo salvaje. Como control negativo, se agregó buffer (solamente) a las células en un volumen equivalente al volumen más alto agregado con Ryk-Fc, sin efectos de consideración. Además, se analizó la endotoxina en concentraciones de 0,1 Eu/ml y 1 Eu/ml para determinar si la endotoxina podía ser responsable por el efecto inhibitorio. La concentración de endotoxina en los receptáculos tratados con Ryk-Fc varió de $0,7 \times 10^{-8}$ Eu/ml a 0,7 Eu/ml para la concentración de Ryk-Fc de 2,5 fM y 250 nM, respectivamente. Los resultados demuestran que la endotoxina sola no pudo ser responsable del efecto inhibitorio (no se exhiben datos).

EJEMPLO 3

Se evaluó in vitro el efecto de otra proteína Ryk variante utilizando el ensayo con matriz MATRIGEL con HUVEC. Se preparó Ryk-myc-His en células 293 transfectadas con una construcción plasmídica que contenía el gen Ryk-myc-His de acuerdo con lo descrito anteriormente en el Ejemplo 1. En una configuración similar a la del Ejemplo 2, el sobrenadante que contenía la proteína de fusión Ryk-myc-His fue agregado en diversas diluciones a HUVEC cultivadas en cultivo en matriz MATRIGEL. Veinticuatro horas más tarde, las células fueron fijadas y evaluadas para determinar la organización de tipo capilar

Se ha demostrado que Ryk-myc-His inhibe significativamente la organización de tipo capilar de las HUVEC. En la Figura 5 se presentan los resultados de un experimento representativo. En este experimento, se agregaron a las células sobrenadantes obtenidos de cultivos celulares que expresaban la fusión Ryk-myc-His en diversos factores de dilución, desde 1:4000 a 1:4, con incrementos logarítmicos. Los resultados expuestos en la Figura 5 demuestran que el sobrenadante con contenido de Ryk-myc-His inhibe la organización de tipo capilar en forma dependiente de la dosis. En este experimento, se agregó el sobrenadante obtenido de las células que no expresaban ninguna proteína Ryk variante (medio de células 293), en un factor de dilución de 1:4 como control negativo y se demostró que no tenía efecto sobre la organización de tipo capilar de las HUVEC.

EJEMPLO 4

Se analizó el efecto de la proteína de fusión Ryk-Fc en combinación con factores angiogénicos conocidos, incluyendo bFGF, VEGF e IL-8, en diferentes concentraciones en HUVEC cultivadas en cultivo en matriz MATRIGEL. Veinticuatro horas más tarde, las células fueron fijadas y evaluadas para determinar la organización de tipo capilar. En tres experimentos separados, se demostró que Ryk-Fc inhibía significativamente la organización de tipo capilar independientemente de la presencia de bFGF, VEGF o IL-8. En la Figura 6 se presentan los resultados de un experimento representativo. En este experimento, se agregó Ryk-Fc a las células a razón de 2,5 pM, 2,5 nM y 25 nM en combinación con bFGF (a razón de 5 nM), VEGF (10 nM) o IL-8 (10 nM). Los resultados expuestos en la Figura 6 demuestran que Ryk-Fc inhibía la organización de tipo capilar en forma dependiente de la dosis, ya sea sola o en combinación con bFGF, VEGF o IL-8. En este experimento se agregó IL-8-TVR en una concentración de 250 nM como control positivo. Además, bFGF, VEGF y

IL-8 fueron analizados por separado y demostraron no tener efecto sobre la organización de tipo capilar de las HUVEC. Este resultado sugiere que los estímulos angiogénicos necesarios para la organización de tipo capilar de las HUVEC ya están presentes ya sea en la matriz MATRIGEL o en el medio.

EJEMPLO 5

Se evaluó in vitro el efecto de una variante más de las proteínas Ryk utilizando el ensayo de HUVEC en matriz MATRIGEL. Se analizó Ryk-his, WIF, WIF-Fc, N-WIF-Fc, VIF-his y N-WIF-his en un esquema experimental similar al del Ejemplo 2. Se agregaron los sobrenadantes que contenían proteína Ryk variante en diversas diluciones a HUVEC desarrolladas en cultivo en matriz MATRIGEL. Veinticuatro horas más tarde, las células fueron fijadas y evaluadas para determinar la organización de tipo capilar. Los resultados de un experimento representativo están consignados en las Figuras 7A y 7B. En este experimento, el se analizó el sobrenadante obtenido de células que no expresaban ninguna proteína Ryk variante (medio celular 293) así como IL-8, como controles.

EJEMPLO 6

También se evaluó in vitro la especificidad de la proteína de fusión Ryk-Fc utilizando el ensayo de matriz MATRIGEL con HUVEC. En síntesis, se generó un anticuerpo de cadena simple contra la proteína de fusión Ryk-Fc (scFv1b4). En los ejemplos siguientes se describen los detalles concernientes a este anticuerpo. Sin embargo, en este experimento, se cultivaron HUVEC con proteína de fusión Ryk-Fc 2,5 nM y concentraciones en aumento de scFv1b4. Veinticuatro horas más tarde, las células fueron fijadas y evaluadas para determinar la organización de tipo capilar. Los resultados de un experimento representativo están consignados en la Figura 8. En este experimento, ScFvBB sirvió como control negativo. ScFvBB es un anticuerpo de cadena simple generado contra la bicunina placentaria humana utilizando los métodos descriptos en los siguientes ejemplos.

EJEMPLO 7

Se evaluó in vivo el efecto de la expresión de Ryk-Fc en el modelo de tumor melanoma B16. En términos generales, en este modelos, se infectaron células de melanoma murino B16.F10 (CRL.6475, American Type culture Collection, Manassas, VA) con partículas adenovirales no replicativas que contenían el gen que codifica para RYK-Fc (Ad-RYK-Fc), Interleucina 2 (Ad-IL-2) o VEGF (Ad-VEGF). Veinticuatro horas después de la infección. las células fueron tripsinizadas, lavadas y resuspendidas en PBS. A continuación se inyectó por vía intravenosa una alícuota de células (2×10^5 células en un volumen de 200 μ l). en la vena tecal de ratones hembra C57BL/6 (Charles River Laboratories, Wilmington, MASS) Los animales fueron sacrificados 14 días después de la inyección y se extrajeron los pulmones, que fueron fijados y analizados para determinar el peso y efectuar el recuento de metástasis.

Específicamente, en este ejemplo, se infectaron ex vivo células B16-F10 con partículas adenovirales no replicativos que contienen el gen Ryk-Fc (ad-Ryk-Fc) por espacio de 24 horas y luego se las implantó en ratones C47BL/6 (Charles River Laboratories, Wilmington, MASS) por vía intravenosa a través de la vena tecal. Anteriormente habíamos demostrado, con diversas construcciones adenovirales, que la infección ex vivo de las células B16 llevan a la expresión in vivo de la proteína de interés durante por lo menos 6 días. También se había demostrado que las células B16-F10 colonizan los pulmones y forman metástasis al ser inyectadas por vía subcutánea. A los 14 días de la implantación de las células, los ratones fueron sacrificados y se extrajeron los pulmones. En este modelo, se evalúa la carga tumoral contando las metástasis pulmonares. En este experimento, los controles incluían ratones que habían recibido células B16-F10 sin tratar o células B16-F10 que habían sido infectadas ex vivo con partículas adenovirales no replicativas que contenían el gen de IL-2 (ad-IL-2) o el gen VEGF

(ad-VEGF). En experimentos anteriores, se ha demostrado que la expresión de VEGF tiene un efecto estimulante. Los resultados consignados en la Figura 9 demuestran que las células B16-F10 infectadas con ad-Ryk-Fc daban origen a un menor número de metástasis que las células B16-F10 no infectadas. En este experimento, la expresión de IL-2 también inhibió el desarrollo de tumores, en tanto que la expresión de VEGF estimuló el desarrollo de tumores.

EJEMPLO 8

Se analizó in vivo el efecto de la proteína Ryk variante en el modelo de córnea de rata. En este modelo, se disuelve bFGF recombinante en un pellet de hydron, lo que da lugar a la liberación sostenida de bFGF. Los pellets de Hydron están compuestos por 1 % de Complejo Octasulfato de sacarosa Aluminio, 12 % de Polímero Hydron Tipo NCC en 95 % de alcohol. Se mezclan todos los ingredientes a temperatura ambiente durante la noche. Luego se agrega bFGF a la suspensión en condiciones estériles. En el pellet de Hydron con bFGF se incluyen los materiales de ensayo con posible actividad antiangiogénica, como ser la proteína de fusión Ryk-Fc.

Para generar los pellets, se dispensan 5 microlitros de la suspensión sobre una superficie plástica estéril. Cada pellet contendría normalmente 400 ng de bFGF y cantidades varias de los materiales de ensayo. En este ejemplo, cada pellet contenía 400 ng de bFGF y la proteína Ryk-Fc fue incluida en dosis en el rango de 80 ng a 400 ng. Los pellets se forman a temperatura ambiente en un plazo de 2 horas.

La implantación de los pellets se lleva a cabo en las ratas anestesiadas. En condiciones asépticas, se produce quirúrgicamente una microcavidad (2 mm x 2 mm) cerca del centro de la córnea con una espátula para iris flexible. Los pellets de hydron son previamente remojados con salina, implantados y disueltos en las córneas de las ratas. Las ratas son sacrificadas 7 días más tarde. La visualización

de la angiogénesis en la córnea se intensifica por perfusión del corazón con tinta china. Las ratas de córnea son aisladas, fijadas en formalina durante la noche y montadas en portaobjetos. Se examina el nivel de angiogénesis bajo el microscopio. Se califica el grado de angiogénesis por doble ciego: 0 para falta de angiogénesis, 1 para angiogénesis moderada; 2 para angiogénesis considerable y 3 para angiogénesis extensa.

Los resultados sugieren que Ryk-Fc exhibe inhibición dependiente de la dosis de la angiogénesis inducida por bFGF en este modelo (Figura 10) con una clara reducción de la angiogénesis evidente a 240 ng o más de Ryk-Fc.

EJEMPLO 9

Se generaron anticuerpos humanos contra la proteína Ryk variante de la siguiente manera:

Fully Synthetic Human Combinatorial Antibody Libraries (HuCAL) Based on Modular Consensus Frameworks and CDRs Randomized with Trinucleotides (Achim Knappik, Liming Ge, Annemarie Honégger, Peter Pack, Melanie Fischer, Günter Wellnhofer, Adolf Hoess, Joachim Wölle, Andreas Plückthun, Bernhard Virekâs *Journal of Molecular Biology*, Vol. 296, No. 1, Febrero de 2000, pág. 57-86) es una referencia que detalla las genotecas de HuCAL y se la incorpora a la presente como referencia en su totalidad.

Selección de fagos HuCAL:

Se revistieron tres receptáculos de una placa microtituladora Maxisorp (F96 Maxisorp Nunc-Immuno Plate) con 200 µl de Ryk-Fc en una concentración de 50 µg/ en PBS incubado a 64 a 4°C. La solución antigénica fue retirada y los receptáculos lavados 2X con 400 µl de PBS, luego bloqueados con 400 µl de MPBS al 5 % (PBS que contenía 5 % de leche en polvo descremada, con bajo contenido de grasa, <1 %) durante 2 h a TA en un agitador de placas microtituladoras. Durante este lapso, se mezclaron 100 µl de la preparación del

fago (10^{11} - 10^{12} tu) con 100 μ l de MPBS al 5 %-0,1 % Tween 20 que contenía 312,5 μ g/ml de IL α R-Fc como proteína de bloqueo, y se lo incubó por espacio de 2 h a TA agitando suavemente. Después del bloqueo, los receptáculos revestidos fueron lavados 2X con 400 μ l de PBS. La mezcla de fagos previamente bloqueada (200 μ l) fue transferida a cada receptáculo revestido, se selló la placa y se la incubó por espacio de 30 min a TA en el agitador de placas microtituladoras, tras lo cual hubo 30 minutos más de reposo a TA. Se retiró la solución de fagos y se lavaron los receptáculos de la siguiente manera:

1ª ronda de selección: 3x 400 μ l de PBST (PMB que contenía 0,05 % de Tween 20) rápido –2x 400 μ l de PBST durante 5 min en un agitador a TA; 3x 400 μ l de PBS rápidamente –2x 400 μ l de PBS por espacio de 5 min en un agitador a TA.

2ª ronda de selección: 1x 400 μ l de PBST rápido –4x 400 μ l de PBST durante 5 min en un agitador a TA; 1x 400 μ l de PBS rápido –4x 400 μ l de PBS por espacio de 5 min en un agitador a TA.

Se eluyó el fago unido por incubación durante 10 minutos con 200 μ l de trietilamina 100 mM. El producto eluido fue rápidamente neutralizado transfiriéndolo a un tubo que contenía 100 μ l de Tris-HCl 1 M, pH 7,0. El resto del fago contenido en el receptáculo de selección fue rescatado mediante la adición de 200 μ l de células TG1 de *E. coli* a DO_{600nm} de 0,8. Al mismo tiempo, se agregaron 4,5 ml de un cultivo de TG1 de *E. coli* a una DO_{600nm} de 0,8 al fago eluido neutralizado y se incubó tanto el tubo en cuestión como la placa microtituladora por espacio de 45 min a 37°C sin agitación. Se combinaron las dos muestras de TG1 de *E. Coli* infectadas y se las centrifugó durante 2 min a 5000 g. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet y se lo aplicó a una placa de agar de 150 mm LB/Cm/Glu (metio 2xTY, 34 μ g/ml de cloranfenicol, 1 % de glucosa), que fue incubada durante la noche a 30°C.

Rescate del Fago Seleccionado:

Las bacterias fueron desprendidas de la placa de agar con 2 ml de 2xTY/Cm/Glu que contenía 15 % de glicerol. Se inocularon 10 ml de medio 2xTY/Cm/Glu (en tubos plásticos de 50 ml) con 86 µl de bacterias y se los incubó durante 45 min a 37°C con agitación a 250 rpm. Cinco mL fueron transferidos al tubo de cultivo, se agregaron 50 µl de fago auxiliar y se incubó el tubo en un baño acuoso por espacio de 30 min a 37°C sin agitación, seguidos por 30 in a 37°C en un agitador a 250 rpm. Las bacterias fueron cosechadas por centrifugación a 4500 g por espacio de 5 min a 4°C. El pellet fue resuspendido en 25 ml de 2xTY/Cm/50 mg/mL Kan/IPTG 1 mM sin glucosa, luego incubado a 30°C, agitando a 250 rpm durante la noche.

Preparación y Subclonación del Fago seleccionado:

Las bacterias fueron tableteadas por centrifugación y se recuperó el fago del sobrenadante por precipitación con 5 ml de PEG/NaCl. El pellet de Fago fue resuspendido en 1 ml de PBS estéril, aclarado por centrifugación, filtrado a través de un filtro de jeringa de 0,8 µm y almacenado a 4°C. Se llevó a cabo la segunda ronda de selección de la manera antes descripta, utilizando esta preparación de fago en lugar de la preparación de fagos primaria de la genoteca HuCAL.

Después de la segunda ronda de selección, las bacterias fueron arrancadas de dos placas de agar con 2 ml de 2xTY/Cm/Glu que contenía 15 % de glicerol. Se utilizaron 500 microlitros del raspado de cada placa directamente para un "miniprep" (minipreparación). Se preparó ADN por un método de minipreparación y se lo digirió con EcoRI y XbaI. La banda de scFv obtenida del grupo de clones seleccionados de HuCAL TAG-CAL fue ligada por métodos standard al vector de expresión pMx7_FH. La reacción de ligamiento fue transformada en JM83 de *E. coli* y aplicada en placas de agar LB/CM/Glu.

Microexpresión de scFv:

Se eligieron colonias únicas de la transformación y se las inoculó en distribución reticulada en una placa de agar LB/Cm/1 % de Glu de 150 mm y en placas microtituladoras de 96 receptáculos que contenían 100 μ l de medio 2xTY/Cm/1 %Glu. La placa fue sellada con cinta permeable al gas e incubada O/N a 38°C con agitación. Para la microexpresión, se transfirieron aproximadamente 5 μ l por receptáculo de la placa maestra al correspondiente receptáculo de una nueva placa de cultivo que contenía 100 μ l de 2xTY/Cm/0,1%Glu. La placa de cultivo fue incubada a 37°C con agitación durante 4 horas, luego inducida por la adición de 100 μ l/receptáculo de 2xTY/Cm que contenía IPTG 1 mM. La placa fue incubada durante 4 horas más a 30°C con agitación. La placa fue centrifugada para granular las bacterias, se retiraron los sobrenadantes y se agregaron 125 μ g/receptáculo de BBS helado (ácido bórico 100 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0). La placa fue herméticamente cerrada e incubada durante la noche a 4°C con agitación. Las bacterias fueron tableteadas por centrifugación y se utilizaron 50 μ l de los sobrenadantes en el siguiente ELISA del scFv.

ELISA de scFv:

Se revistió una placa microtituladora Maxisorp con 100 μ l de Ryk-Fc en PBS (5 μ g/ml) por receptáculo durante la noche a 4°C. Se retiró la solución antigénica y se bloqueó a la placa por espacio de 2 h con 400 μ l/receptáculo de MPBS 5 % en un agitador de placas microtituladoras a TA. Las placas fueron enjuagadas una vez con 400 μ l por receptáculo de TBST (Tris HCl 50 mM, pH 8,4, NaCl 15 mM, Tween-20 al 0,5 %) y se distribuyeron 50 μ l de MTBST 5 % (TBST que contenía 5% de leche descremada) en cada receptáculo. Se transfirieron los sobrenadantes de la anterior placa de microexpresión (50 μ l/receptáculo) a los correspondientes receptáculos de la placa de ELISA revestida con el antígeno, que fue incubada durante 1,5 h a TA en un agitador de placas microtituladoras.

Las placas fueron lavadas 5x rápidamente con TBST + CaCl_2 1 mM. Se agregó a la placa una mezcla de anticuerpos monoclonales anti-FLAG-tag de ratón M1 (Sigma F-3040) y M2 (Sigma F-3165) cada uno de los cuales había sido diluido 1:10000 en TBST + CaCl_2 1 mM (100 μL /receptáculo), placa que luego fue incubada durante 1 h a TA en un agitador de placas microtituladoras. La placa fue lavada 5x rápidamente con TBST + CaCl_2 1 mM y se agregaron 100 μL de conjugado anti IgG-HRP de ratón (Sigma A-6782) diluido 1:10.000 en TBST + CaCl_2 1 mM en cada receptáculo, seguidos por incubación durante 1 h a TA en un agitador de placas microtituladoras. La placa fue lavada 5x rápidamente con TBST + CaCl_2 1 mM y se agregaron 100 μL /receptáculo de Sustrato de Peroxidasa BM azul soluble (Roche) seguidos por incubación durante 30 min a TA. Las señales de ELISA fueron leídas a 370 nm.

ELISA de especificidad.

Se revistieron placas microtituladoras Maxisorp de acuerdo con lo descripto precedentemente con los siguientes antígenos: IL4R-Fc (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$). El ELISA se llevó a cabo de la manera anteriormente descripta.

Secuenciación de scFv ELISA-positivos:

Los clones ELISA-positivos fueron inoculados de la placa de agar reticulada en 2XYT/Cm/1%Glu 1,2 mL en una placa microtituladora de receptáculos profundos e incubados durante 24 h a 37°C con agitación. Se preparó ADN utilizando el QiaRobot y se lo secuenció utilizando los cebadores HuCAL para (TACCGTTGCTCTTCACCC) y HuCAL inv (TTTTTCACTTCACAGGTC). Las secuencias de ADN fueron compradas por métodos standard de alineación para identificar las secuencias únicas de scFv y para determinar las secuencias marco de cada clon individual.

Expresión y Purificación a Gran Escala de scFv con cromatografía de afinidad con Ni:

Se aplicó JM83 de *E. coli* que contenía el scFv de HuCAL en una placa de agar LB/Cm/Glu y se incubó durante la noche a 37°C. Se inoculó un cultivo de 10 ml en medio 2xTY/Cm/1%Glu de una sola colonia y se lo incubó durante la noche a 30°C en un agitador. Un matraz con deflector que contenía 500 ml de medio 2xTY/Cm/1%Glu fue inoculado con 2,5 ml del cultivo fresco de la noche e incubado durante 6 h a 30°C en un agitador a 180 rpm, $DO_{600nm} = 0,5$. El cultivo bacteriano fue enfriado al hielo para alcanzar la TA y se agregó IPTG a una concentración final de 0,5 mM. El scFv fue expresado a 22°C durante la noche, agitando a 180 rpm a una DO_{600nm} de 0,5. Las bacterias fueron cosechadas por centrifugación a 5000 g por espacio de 20 min a 4°C. El pellet fue resuspendido en 100 ml de buffer de ensayo previamente enfriado (Tris 100 mM, EDTA 1 mM pH 8,0) y desestabilizado utilizando un desestabilizador celular de MicroFluidics. Se retiraron los desechos bacterianos por centrifugación a 20.000 g por espacio de 30 min a 4°C. Se filtró el sobrenadante a través de un filtro de 0,2 μm (baja unión proteica) y se lo aplicó a una columna Poros quelante de metales de Perseptive Biosystems. Después de lavar con 10 volúmenes de columna de buffer de ensayo, el scFv fue eluido con 10 volúmenes de columna de buffer de elución (buffer de ensayo + imidazol 250 mM). Las fracciones eluidas fueron dializadas en PBS por métodos standard, divididas en alícuotas y almacenadas a -20°C.

EJEMPLO 10

Expresión de IB4, un anticuerpo scFv de cadena simple anti-Ryk

Un cultivo nocturno del Clon 1B4 del equipo de anticuerpos de Morphosys (Marina Roell) fue cultivado en medio 2-YT con 1 % de glucosa y 34 $\mu g/ml$ de cloranfenicol a 30°C. Se utilizaron 10 ml del cultivo nocturno para inocular un cultivo de 1 l en medio 2-YT con 0,1 % de glucosa y 34 $\mu g/ml$ de cloranfenicol. El cultivo se llevó a cabo a 30°C hasta que se obtuvo una absorbancia de 0,5 a 600 nm. La temperatura se redujo a 25°C y se indujo la expresión del anticuerpo IB4

mediante la adición de 500 μ l de IPTG 1 M. Las células fueron cosechadas después de una inducción que duró toda la noche.

Purificación de IB4, un anticuerpo scFv de cadena simple anti-Ryk

Las células fueron tableteadas por centrifugación (2660 x g) y el pellet fue resuspendido en fosfato de sodio 20 mM, pH 7,4, NaCl 0,5 M, imidazol 10 mM que contenía 1 ml de un cocktail de inhibidores de la proteasa (Sigma) (Buffer A) y lisadas utilizando un microfluidizador (Microfluidics, Inc.) a una presión de 15.000 psi (103,4 MPa). El sobrenadante fue centrifugado a 10.640 xg, filtrado y aplicado a una columna de quelante metálico Poros MC (Perseptive Biosystems) que había sido cargada con Ni⁺ de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de la carga, se lavó la columna con el buffer A y se eluyó la proteína con un gradiente escalonado de imidazol, 30, 60, 90 y 250 mM en buffer A. El pico de anticuerpos IB4 fue dializado en buffer que contenía Hepes 10 mM, pH 7,5 y NaCl 10 mM (Buffer B) por espacio de 4 h a 4°C, filtrado e inyectado en una columna de intercambio iónico Mono Q 5/5 que había sido equilibrada en Buffer B utilizando una velocidad de flujo de 1 ml/min. Después del lavado con Buffer B para eliminar el material no unido, se eluyó la proteína empleando un gradiente de NaCl de 0 a 0,5 M en Buffer B. El pico que contenía el anticuerpo IB4 anti Ryk fue recogido, analizado para detectar la endotoxina utilizando un kit de ensayo QCL-1000 de acuerdo con las sugerencias del fabricante (Biowhittaker, Walkersville, MD). Debido a que el nivel de endotoxina en este pico fue considerable (1600 EU/ml), la columna Mono Q fue limpiada para eliminar la contaminación con la endotoxina y se volvió a aplicar el anticuerpo diluyendo en primer lugar al pico 1:5 con Buffer B y se lo volvió a inyectar. El pico producido fue vuelto a analizar para detectar la endotoxina..

Metodología BIACORE . Valores de K_d para anticuerpos para Ryk variante humana que se unen a la proteína Ryk variante humana.

Se realizaron experimentos utilizando un BIACORE 2000 (Pharmacia) a 25°C. El buffer de ensayo era BIACORE HBS-EP (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, Tensioactivo P20 0,005 %, pH 7,4). El anticuerpo scFv 1B4 anti-Ryk fue acoplado con amina a un chip sensor CM5 activando en primer lugar la superficie con una mezcla 1:1 de clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) (1M) y N-hidroxisuccinimida (0,25 M) a razón de 5 µl/min. El anticuerpo fue diluido hasta 1,8 µg/ml en acetato de sodio 10 M, pH 4,5 e inyectado hasta obtener 250 unidades de respuesta (RU). Después de la unión, el resto de los sitios activos en la superficie del sensor fue bloqueado con 35 µl de etanolamina 1 M, pH 8,5, a 5 µl/min. Se inyectaron diversas concentraciones de Ryk-Fc (30 a 242 nM) en buffer de ensayo sobre la superficie (inyección de 60 µl/ índice de flujo 30 µl/min) para seguir la asociación Ryk-Fc-anticuerpo. La Ryk-Fc-anticuerpo fue seguida inmediatamente después de cada reacción de asociación por una inyección de dos minutos de buffer de ensayo. La regeneración de la superficie del chip BIAcore se logró inyectando 50 µl de glicina pH 2,5 10 mM, a una velocidad de flujo de 100 µl/min. Las constantes de velocidad de asociación (k_{on}) y disociación (k_{off}) fueron determinadas por un ajuste global de los datos utilizando la versión 3.1 de BIAeval con el modelo $A + B \rightarrow AB$. Los valores de K_D se calcularon a partir de la relación de k_{off} a k_{on} .

El anticuerpo 1B4 scFv anti-Ryk fue purificado de lisados de *E. coli* por quelación secuencial y cromatografía de intercambio iónico. La mayor parte del anticuerpo eluyó de la columna quelante Poros MC a 250 mM de imidazol. El anticuerpo 1B4 scFv anti-Ryk también eluyó en los lavados anteriores, aunque estos picos no se combinaron con la elevada elución con imidazol. Se detectó un total de 11,7 unidades A280 nm en la acumulación final. La primera elución en columna Mono Q contenía múltiples picos, los primeros 2 de los cuales fueron considerados anticuerpos 1B4 scFv (Figura 11). Como los niveles de endotoxina

en los picos eran significativos (1600 EU/ml), se operó otra columna Mono-Q posterior tras un extenso lavado para eliminar la endotoxina del sistema AKTA FPLC y la columna de intercambio iónico. El Pico 2 fue aplicado nuevamente a la columna Mono-Q (Figura 12) y se determinó que el rendimiento final de endotoxina era de 4,0 EU/ml. Se consideró que la preparación final de 1B4 scFv anti-Ryk era sumamente pura, según determinación por SDS-PAGE (figura 13).

El instrumento BIAcore 2000 es una poderosa herramienta en el análisis de las interacciones proteína-proteína. Utilizando las condiciones de acoplamiento apropiadas, se pueden determinar las constantes precisas de asociación y disociación para la unión del anticuerpo al antígeno. La Figura 14 ilustra los sensogramas generados para la unión de diversas concentraciones de Ryk-Fc a una concentración fija de anticuerpo 1B4 scFv anti-Ryk inmovilizado. Las constantes cinéticas calculadas a partir de estas representaciones gráficas están consignadas a continuación, en la Tabla 1. Se calculó un valor KD de 13,3 nM para esta interacción, lo que demuestra una alta afinidad entre los dos componentes de la unión.

TABLA 1

Propiedades cinéticas de unión del anticuerpo 1B4 scFv anti-Ryk con Ryk-Fc

ka (1/Ms)	Kd (seg ⁻¹)	KD (M)
5,0 x 10 ⁻⁴	6,7 x 10 ⁻⁴	13,3 x 10 ⁻⁹

CONCLUSIÓN

No se había dado a conocer la implicancia de Ryk en la angiogénesis. Si bien se ha demostrado la sobreexpresión de Ryk en el cáncer ovárico, aún no se ha determinado su rol en el cáncer. Ahora hemos encontrado que las novedosas proteínas Ryk variantes exhiben, muy sorprendentemente, actividad moduladora de la angiogénesis.

Ahora hemos descubierto que la proteína Ryk de tipo salvaje u otras proteínas Ryk variantes descritas en la presente pueden ser de importancia como agentes terapéuticos para cualquier enfermedad en la que esté implicada la angiogénesis, incluyendo, aunque sin limitarse, al cáncer, la cicatrización de heridas, las retinopatías diabéticas, la degeneración macular y las enfermedades cardiovasculares. Las proteínas Ryk variantes descritas en la presente pueden ser utilizadas asimismo en el tratamiento de trastornos clínicos que conllevan la angiogénesis en el aparato reproductor, incluyendo la regulación de la vascularización placentaria, la regulación del embarazo o el uso como abortivo. Además de su uso terapéutico potencial, los polipéptidos de la presente invención pueden tener uso en aplicaciones de diagnóstico, al igual que los polinucleótidos que codifican para los polipéptidos de la presente invención, y los anticuerpos para los polipéptidos de la presente invención.

Los ejemplos que anteceden tienen por fin ilustrar la invención y se piensa que los expertos en la técnica podrán idear variaciones. En consecuencia, se pretende que el alcance de la presente invención debe ser limitado únicamente por las reivindicaciones siguientes.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Roczniak, Steve
Dubois-Stringfellow, Nathalie
Zolotorev, Alya

<120> Método para Regular la Angiogénesis Utilizando Proteína Ryk

<130> MSB-7266

<150> US 09/568,783

<151> 2000-05-10

<160> 23

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 191

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ala	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Glu	Leu	Gln	Ser	Ala	Ser	Ala	Gly	Pro	1	5	10	15
Ser	Val	Ser	Leu	Tyr	Leu	Ser	Glu	Asp	Glu	Val	Arg	Arg	Leu	Ile	Gly	20	25	30	
Leu	Asp	Ala	Glu	Leu	Tyr	Tyr	Val	Arg	Asn	Asp	Leu	Ile	Ser	His	Tyr	35	40	45	
Ala	Leu	Ser	Phe	Asn	Leu	Leu	Val	Pro	Ser	Glu	Thr	Asn	Phe	Leu	His	50	55	60	
Phe	Thr	Trp	His	Ala	Lys	Ser	Lys	Val	Glu	Tyr	Lys	Leu	Gly	Phe	Gln	65	70	75	80
Val	Asp	Asn	Val	Leu	Ala	Met	Asp	Met	Pro	Gln	Val	Asn	Ile	Ser	Val	85	90	95	
Gln	Gly	Glu	Val	Pro	Arg	Thr	Leu	Ser	Val	Phe	Arg	Val	Glu	Leu	Ser	100	105	110	
Cys	Thr	Gly	Lys	Val	Asp	Ser	Glu	Val	Met	Ile	Leu	Met	Gln	Leu	Asn	115	120	125	
Leu	Thr	Val	Asn	Ser	Ser	Lys	Asn	Phe	Thr	Val	Leu	Asn	Phe	Lys	Arg	130	135	140	
Arg	Lys	Met	Cys	Tyr	Lys	Lys	Leu	Glu	Glu	Val	Lys	Thr	Ser	Ala	Leu				

145 150 155 160
 Asp Lys Asn Thr Ser Arg Thr Ile Tyr Asp Pro Val His Ala Ala Pro
 165 170 175
 Thr Thr Ser Thr Arg Val Phe Tyr Ile Ser Val Gly Val Cys Cys
 180 185 190

 <210> 2
 <211> 181
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 2

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

<210> 3

<211> 180
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

Met Arg Gly Ala Ala Arg Leu Gly Arg Pro Gly Arg Ser Cys Leu Pro
 1 5 10 15

Gly Ala Arg Gly Leu Arg Ala Pro Pro Pro Pro Pro Leu Leu Leu Leu
 20 25 30

Leu Ala Leu Leu Pro Leu Leu Pro Ala Pro Gly Ala Ala Ala Ser Val
 35 40 45

Ser Leu Tyr Leu Ser Glu Asp Glu Val Arg Arg Leu Ile Gly Leu Asp
 50 55 60

Ala Glu Leu Tyr Tyr Val Arg Asn Asp Leu Ile Ser His Tyr Ala Leu
 65 70 75 80

Ser Phe Asn Leu Leu Val Pro Ser Glu Thr Asn Phe Leu His Phe Thr
 85 90 95

Trp His Ala Lys Ser Lys Val Glu Tyr Lys Leu Gly Phe Gln Val Asp
 100 105 110

Asn Val Leu Ala Met Asp Met Pro Gln Val Asn Ile Ser Val Gln Gly
 115 120 125

Glu Val Pro Arg Thr Leu Ser Val Phe Arg Val Glu Leu Ser Cys Thr
 130 135 140

Gly Lys Val Asp Ser Glu Val Met Ile Leu Met Gln Leu Asn Leu Thr
 145 150 155 160

Val Asn Ser Ser Lys Asn Phe Thr Val Leu Asn Phe Lys Arg Arg Lys
 165 170 175

Met Cys Tyr Lys
 180

<210> 4
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> rótulo Fc

<400> 4

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

<210> 5
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5

Met Arg Gly Ala Ala Arg Leu Gly Arg Pro Gly Arg Ser Cys Leu Pro
1 5 10 15

Gly Ala Arg Gly Leu Arg Ala Pro Pro Pro Pro Pro Leu Leu Leu Leu
20 25 30

Leu Ala Leu Leu Pro Leu Leu Pro Ala Pro Gly Ala Ala Ala
35 40 45

<210> 6
<211> 607
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Arg Gly Ala Ala Arg Leu Gly Arg Pro Gly Arg Ser Cys Leu Pro
1 5 10 15

Gly Ala Arg Gly Leu Arg Ala Pro Pro Pro Pro Pro Leu Leu Leu Leu
20 25 30

Leu Ala Leu Leu Pro Leu Leu Pro Ala Pro Gly Ala Ala Ala Ala Pro
35 40 45

Ala Pro Arg Pro Pro Glu Leu Gln Ser Ala Ser Ala Gly Pro Ser Val
50 55 60

Ser Leu Tyr Leu Ser Glu Asp Glu Val Arg Arg Leu Ile Gly Leu Asp
65 70 75 80

Ala Glu Leu Tyr Tyr Val Arg Asn Asp Leu Ile Ser His Tyr Ala Leu
85 90 95

Ser Phe Asn Leu Leu Val Pro Ser Glu Thr Asn Phe Leu His Phe Thr
100 105 110

Trp His Ala Lys Ser Lys Val Glu Tyr Lys Leu Gly Phe Gln Val Asp
115 120 125

Asn Val Leu Ala Met Asp Met Pro Gln Val Asn Ile Ser Val Gln Gly
130 135 140

Glu Val Pro Arg Thr Leu Ser Val Phe Arg Val Glu Leu Ser Cys Thr
145 150 155 160

Gly Lys Val Asp Ser Glu Val Met Ile Leu Met Gln Leu Asn Leu Thr
165 170 175

Val Asn Ser Ser Lys Asn Phe Thr Ala Leu Asn Phe Lys Arg Arg Lys
180 185 190

Met Cys Tyr Lys Lys Leu Glu Glu Val Lys Thr Ser Ala Leu Asp Lys
 195 200 205
 Asn Thr Ser Arg Thr Ile Tyr Asp Pro Val His Ala Ala Pro Thr Thr
 210 215 220
 Ser Thr Arg Val Phe Tyr Ile Ser Val Gly Val Cys Cys Ala Val Ile
 225 230 235 240
 Phe Leu Val Ala Ile Ile Leu Ala Val Leu His Leu His Asn Met Lys
 245 250 255
 Arg Ile Glu Leu Asp Asp Ser Ile Ser Ala Ser Ser Ser Ser Gln Gly
 260 265 270
 Leu Ser Gln Pro Ser Thr Gln Thr Thr Gln Tyr Leu Arg Ala Asp Thr
 275 280 285
 Pro Asn Asn Ala Thr Pro Ile Thr Ser Tyr Pro Thr Leu Arg Ile Glu
 290 295 300
 Lys Asn Asp Leu Arg Ser Val Thr Leu Leu Glu Ala Lys Gly Lys Val
 305 310 315 320
 Lys Asp Ile Ala Ile Ser Arg Glu Arg Ile Thr Leu Lys Asp Val Leu
 325 330 335
 Gln Glu Gly Thr Phe Gly Arg Ile Phe His Gly Ile Leu Ile Asp Glu
 340 345 350
 Lys Asp Pro Asn Lys Glu Lys Gln Ala Phe Val Lys Thr Val Lys Asp
 355 360 365
 Gln Ala Ser Glu Ile Gln Val Thr Met Met Leu Thr Glu Ser Cys Lys
 370 375 380
 Leu Arg Gly Leu His His Arg Asn Leu Leu Pro Ile Thr His Val Cys
 385 390 395 400
 Ile Glu Glu Gly Glu Lys Pro Met Val Ile Leu Pro Tyr Met Asn Trp
 405 410 415
 Gly Asn Leu Lys Leu Phe Leu Arg Gln Cys Lys Leu Val Glu Ala Asn
 420 425 430
 Asn Pro Gln Ala Ile Ser Gln Gln Asp Leu Val His Met Ala Ile Gln
 435 440 445
 Ile Ala Cys Gly Met Ser Tyr Leu Ala Arg Arg Glu Val Ile His Lys
 450 455 460
 Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Val Ile Asp Asp Thr Leu Gln Val Lys

```

<210> 7
<211> 414
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> fusión de fragmento de proteína humana y rótulo Fc

<400> 7

Ala Pro Ala Pro Arg Pro Pro Glu Leu Gln Ser Ala Ser Ala Gly Pro
1 5 10 15
Ser Val Ser Leu Tyr Leu Ser Glu Asp Glu Val Arg Arg Leu Ile Gly
20 25 30
Leu Asp Ala Glu Leu Tyr Tyr Val Arg Asn Asp Leu Ile Ser His Tyr
35 40 45
Ala Leu Ser Phe Asn Leu Leu Val Pro Ser Glu Thr Asn Phe Leu His
50 55 60
Phe Thr Trp His Ala Lys Ser Lys Val Glu Tyr Lys Leu Gly Phe Gln
65 70 75 80
Val Asp Asn Val Leu Ala Met Asp Met Pro Gln Val Asn Ile Ser Val

```

85										90					95				
Gln	Gly	Glu	Val	Pro	Arg	Thr	Leu	Ser	Val	Phe	Arg	Val	Glu	Leu	Ser				
			100					105					110						
Cys	Thr	Gly	Lys	Val	Asp	Ser	Glu	Val	Met	Ile	Leu	Met	Gln	Leu	Asn				
		115					120					125							
Leu	Thr	Val	Asn	Ser	Ser	Lys	Asn	Phe	Thr	Ala	Leu	Asn	Phe	Lys	Arg				
	130					135					140								
Arg	Lys	Met	Cys	Tyr	Lys	Lys	Leu	Glu	Glu	Val	Lys	Thr	Ser	Ala	Leu				
145					150					155					160				
Asp	Lys	Asn	Thr	Ser	Arg	Thr	Ile	Tyr	Asp	Pro	Val	His	Ala	Ala	Pro				
				165					170					175					
Thr	Thr	Ser	Thr	Arg	Ala	Ala	Ala	Asp	Asp	Asp	Asp	Lys	Thr	His	Thr				
			180					185						190					
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe				
		195					200					205							
Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro				
	210					215					220								
Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val				
225					230					235				240					
Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr				
				245					250					255					
Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val				
			260					265					270						
Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys				
		275					280					285							
Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser				
	290					295					300								
Lys	Ala	Lys	Cys	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro				
305					310					315				320					
Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val				
			325					330					335						
Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly				
			340					345					350						
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp				
		355					360					365							

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 370 375 380

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 385 390 395 400

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 405 410

<210> 8
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> fusión de fragmento de proteína humana y rótulo myc-his

<400> 8

Ala Pro Ala Pro Arg Pro Pro Glu Leu Gln Ser Ala Ser Ala Gly Pro
 1 5 10 15

Ser Val Ser Leu Tyr Leu Ser Glu Asp Glu Val Arg Arg Leu Ile Gly
 20 25 30

Leu Asp Ala Glu Leu Tyr Tyr Val Arg Asn Asp Leu Ile Ser His Tyr
 35 40 45

Ala Leu Ser Phe Asn Leu Leu Val Pro Ser Glu Thr Asn Phe Leu His
 50 55 60

Phe Thr Trp His Ala Lys Ser Lys Val Glu Tyr Lys Leu Gly Phe Gln
 65 70 75 80

Val Asp Asn Val Leu Ala Met Asp Met Pro Gln Val Asn Ile Ser Val
 85 90 95

Gln Gly Glu Val Pro Arg Thr Leu Ser Val Phe Arg Val Glu Leu Ser
 100 105 110

Cys Thr Gly Lys Val Asp Ser Glu Val Met Ile Leu Met Gln Leu Asn
 115 120 125

Leu Thr Val Asn Ser Ser Lys Asn Phe Thr Ala Leu Asn Phe Lys Arg
 130 135 140

Arg Lys Met Cys Tyr Lys Lys Leu Glu Glu Val Lys Thr Ser Ala Leu
 145 150 155 160

Asp Lys Asn Thr Ser Arg Thr Ile Tyr Asp Pro Val His Ala Ala Pro
 165 170 175

Thr Thr Ser Thr Arg Val Phe Tyr Ile Ser Val Gly Val Cys Cys Leu
 180 185 190
 Glu Ser Arg Gly Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn
 195 200 205
 Ser Ala Val Asp His His His His His His
 210 215

<210> 9
 <211> 408
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> fusión de fragmento de proteína humana y rótulo Fc

<400> 9

Met Arg Gly Ala Ala Arg Leu Gly Arg Pro Gly Arg Ser Cys Leu Pro
 1 5 10 15
 Gly Ala Arg Gly Leu Arg Ala Pro Pro Pro Pro Pro Leu Leu Leu Leu
 20 25 30
 Leu Ala Leu Leu Pro Leu Leu Pro Ala Pro Gly Ala Ala Ala Ser Val
 35 40 45
 Ser Leu Tyr Leu Ser Glu Asp Glu Val Arg Arg Leu Ile Gly Leu Asp
 50 55 60
 Ala Glu Leu Tyr Tyr Val Arg Asn Asp Leu Ile Ser His Tyr Ala Leu
 65 70 75 80
 Ser Phe Asn Leu Leu Val Pro Ser Glu Thr Asn Phe Leu His Phe Thr
 85 90 95
 Trp His Ala Lys Ser Lys Val Glu Tyr Lys Leu Gly Phe Gln Val Asp
 100 105 110
 Asn Val Leu Ala Met Asp Met Pro Gln Val Asn Ile Ser Val Gln Gly
 115 120 125
 Glu Val Pro Arg Thr Leu Ser Val Phe Arg Val Glu Leu Ser Cys Thr
 130 135 140
 Gly Lys Val Asp Ser Glu Val Met Ile Leu Met Gln Leu Asn Leu Thr
 145 150 155 160
 Val Asn Ser Ser Lys Asn Phe Thr Val Leu Asn Phe Lys Arg Arg Lys
 165 170 175

Met Cys Tyr Lys Ser Arg Gly Pro Phe Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 180 185 190
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 195 200 205
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 210 215 220
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 225 230 235 240
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 245 250 255
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 260 265 270
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 275 280 285
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 290 295 300
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 305 310 315 320
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 325 330 335
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 340 345 350
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 355 360 365
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 370 375 380
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 385 390 395 400
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 405

<210> 10
 <211> 204
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> fusión de fragmento de proteína humana y rótulo V5-his

<400> 10

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

<210> 11

<211> 51

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia aleatoria ilustrativa

<400> 11

Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Ala Asn Pro Gln Leu
1 5 10 15

Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu
20 25 30

Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln
35 40 45

Val Leu Phe
50

<210> 12
<211> 52
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> secuencia aleatoria ilustrativa

<400> 12

Arg Ala Pro Phe Lys Lys Ser Trp Ala Tyr Leu Gln Val Ala Lys His
1 5 10 15

Lys Leu Ser Trp Asn Lys Asp Gly Ile Leu His Gly Val Arg Tyr Gln
20 25 30

Asp Gly Asn Leu Val Ile Gln Phe Pro Gly Leu Tyr Phe Ile Ile Cys
35 40 45

Gln Leu Gln Phe
50

<210> 13
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> péptido marcador FLAG

<400> 13

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 14
<211> 711
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 14

atgcgtaggg	cggcgcggct	ggggcgggcg	ggccggagtt	gcctcccggg	ggcccgcggc	60
ctgagggccc	cgccgccgcc	gccgctgctg	cttctgcttg	cgctgttgcc	gctgctgcc	120
gcgcctggcg	ctgccgccgc	ccccgccccg	cgccccccgg	agctgcagtc	ggcttccgcg	180
gggcccagcg	tgagtctcta	cctgagcgag	gacgaggtgc	gccggctgat	cggtcttgat	240
gcagaacttt	attatgtgag	aaatgacctt	attagtcact	acgctctatc	ctttaatctg	300
ttagtaccga	gtgagacaaa	tttcctgcac	ttcacctggc	atgcgaagtc	caagggtgaa	360
tataagctgg	gattccaagt	ggacaatggt	ttggcaatgg	atatgccccca	ggccaacatt	420
tctgttcagg	gggaagttcc	acgcacttta	tcagtgtttc	gggtagagct	ttcctgtact	480
ggcaaagtag	attctgaagt	tatgatacta	atgcagctca	acttgacagt	aaattcttca	540
aaaaatttta	ccgtcttaaa	ttttaaacga	aggaaaatgt	gctacaaaaa	acttgaagaa	600
gtaaaaactt	cagccttgga	caaaaacact	agcagaacta	tttatgatcc	tgtacatgca	660
gctccaacca	cttctacgcg	tgtgttttat	attagtgtag	gggtttgttg	t	711

<210> 15

<211> 681

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

atgcgtaggg	cggcgcggct	ggggcgggcg	ggccggagtt	gcctcccggg	ggcccgcggc	60
ctgagggccc	cgccgccgcc	gccgctgctg	cttctgcttg	cgctgttgcc	gctgctgcc	120
gcgcctggcg	ctgccgccgc	ccccgccccg	cgccccccgg	agctgcagtc	ggcttccgcg	180
gggcccagcg	tgagtctcta	cctgagcgag	gacgaggtgc	gccggctgat	cggtcttgat	240
gcagaacttt	attatgtgag	aaatgacctt	attagtcact	acgctctatc	ctttaatctg	300
ttagtaccga	gtgagacaaa	tttcctgcac	ttcacctggc	atgcgaagtc	caagggtgaa	360
tataagctgg	gattccaagt	ggacaatggt	ttggcaatgg	atatgccccca	ggccaacatt	420
tctgttcagg	gggaagttcc	acgcacttta	tcagtgtttc	gggtagagct	ttcctgtact	480
ggcaaagtag	attctgaagt	tatgatacta	atgcagctca	acttgacagt	aaattcttca	540
aaaaatttta	ccgtcttaaa	ttttaaacga	aggaaaatgt	gctacaaaaa	acttgaagaa	600

gtaaaaactt cagccttgga caaaaacact agcagaacta tttatgatcc tgtacatgca 660
gctccaacca cttctacgcg t 681

<210> 16
<211> 543
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 16
atgcgtgggg cggcgcggct ggggcggccg ggccggagtt gcctcccggg ggcccgcggc 60
ctgagggccc cgccgccgcc gccgctgctg cttctgcttg cgctgttgcc gctgctgccc 120
gcgcctggcg ctgccgccag cgtgagtctc tacctgagcg aggacgaggt gcgccggctg 180
atcggctcttg atgcagaact ttattatgtg agaaatgacc ttattagtca ctacgctcta 240
tcctttaatc tgtagtacc cagtgcgaca aatttcctgc acttcacctg gcatgcgaag 300
tccaagggtg aatataagct gggattccaa gtggacaatg ttttggaat ggatatgccc 360
caggtcaaca tttctgttca gggggaagtt ccacgcactt tatcagtgtt tcgggtagag 420
ctttcctgta ctggcaaagt agattctgaa gttatgatac taatgcagct caacttgaca 480
gtaaattctt caaaaaattt taccgtctta aattttaaac gaaggaaaat gtgctacaaa 540
tga 543

<210> 17
<211> 1383
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> . . . fusión de ADNc humano y secuencia codificadora de rótulo Fc

<400> 17
atgcgtgggg cggcgcggct ggggcggccg ggccggagtt gcctcccggg ggcccgcggc 60
ctgagggccc cgccgccgcc gccgctgctg cttctgcttg cgctgttgcc gctgctgccc 120
gcgcctggcg ctgccgccgc ccccgccccg cggcccccg agctgcagtc ggcttccgcg 180
gggcccagcg tgagtctcta cctgagcgag gacgaggtgc gccggctgat cggctctgat 240
gcagaacttt attatgtgag aaatgacctt attagtcact acgctctatc ctttaatctg 300

ttagtacc	ca gtgagacaaa	tttcctgcac	ttcacctggc	atgcgaagtc	caaggttgaa	360
tataagctgg	gattccaagt	ggacaatgtt	ttggcaatgg	atatgcccc	agtcaacatt	420
tctgttcagg	gggaagttcc	acgcacttta	tcagtgtttc	gggtagagct	ttcctgtact	480
ggcaaagtag	attctgaagt	tatgatacta	atgcagctca	acttgacagt	aaattcttca	540
aaaaatttta	ccgtcttaaa	ttttaaacga	aggaaaatgt	gctacaaaaa	acttgaagaa	600
gtaaaaactt	cagccttgga	caaaaacact	agcagaacta	tttatgatcc	tgtacatgca	660
gctccaacca	cttctacgcg	tgcggccgca	gatgatgatg	acaaaactca	cacatgcccc	720
ccgtgcccag	cacctgaact	cctgggggga	ccgtcagtct	tcctcttccc	cccaaaaccc	780
aaggacaccc	tcatgatctc	ccggaccctt	gaggtcacat	gcgtggtggt	ggacgtgagc	840
cacgaagacc	ctgaggtcaa	gttcaactgg	tacgtggacg	gcgtggaggt	gcataatgcc	900
aagacaaagc	cgcgaggagga	gcagtacaac	agcacgtacc	gtgtggtcag	cgctctcacc	960
gtcctgcacc	aggactggct	gaatggcaag	gagtacaagt	gcaaggctctc	caacaaagcc	1020
ctcccagccc	ccatcgagaa	aacctctctc	aaagccaaag	ggcagccccg	agaaccacag	1080
gtgtacaccc	tgtcccatc	ccgggatgag	ctgaccaaga	accaggtcag	cctgacctgc	1140
ctggtcaaag	gcttctatcc	cagcgacatc	gccgtggagt	gggagagcaa	tgggcagccg	1200
gagaacaact	acaagaccac	gcctcccgtg	ctggactccg	acggctcctt	cttctcttac	1260
agcaagctca	ccgtggacaa	gagcaggtgg	cagcagggga	acgtcttctc	atgctccgtg	1320
atgcatgagg	ctctgcacaa	ccactacacg	cagaagagcc	tctccctgtc	tccgggtaaa	1380
tga						1383

<210> 18
 <211> 795
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>

<223> Fusión de ADNc humano y secuencia codificadora de rótulo myc-his

<400> 18

atgcgtgggg	cggcgcggct	ggggcgggccg	ggccggagtt	gcctcccggg	ggcccgcggc	60
ctgagggccc	cgccgcggcc	gccgtgctg	cttctgcttg	cgctgttgcc	gctgctgcc	120

gcgcctggcg ctgccgccgc ccccgccccg cggcccccg agctgcagtc ggcttccgcg 180
 yggcccagcg tgagtctcta cctgagcgag gacgaggtgc gccggctgat cggctctgat 240
 gcagaacttt attatgtgag aaatgacctt attagtcact acgctctatc ctttaatctg 300
 ttagtaccga gtgagacaaa tttcctgcac ttcacctggc atgcgaagtc caagggtgaa 360
 tataagctgg gattccaagt ggacaatggt ttggcaatgg atatgccccca ggtcaacatt 420
 tctgttcagg gggaagttcc acgcacttta tcagtgtttc gggtagagct ttcctgtact 480
 ggcaaagtag attctgaagt tatgatacta atgcagctca acttgacagt aaattcttca 540
 aaaaatttta ccgtcttaaa ttttaaacga aggaaaatgt gctacaaaaa acttgaagaa 600
 gtaaaaactt cagccttgga caaaaacact agcagaacta tttatgatcc tgtacatgca 660
 gctccaacca cttctacgcg tgtgttttat attagtgtag gggtttggtg tctcgagtct 720
 agagggcccc aacaaaaact catctcagaa gaggatctga atagcgccgt cgaccatcat 780
 catcatcatc attga 795

<210> 19
 <211> 1271
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> fusión de ADNc humano y secuencia codificadora de rótulo Fc

<400> 19
 atgcgtgggg cggcgcggtt ggggcggccg ggccggagtt gcctcccggg ggcccgcggc 60
 ctgagggccc cggcgccgcc gccgctgctg cttctgcttg cgctgttgcc gctgctgccc 120
 gcgcctggcg ctgccgccag cgtgagtctc tacctgagcg aggacgaggt gcgcccggctg 180
 atcggctcttg atgcagaact ttattatgtg agaaatgacc ttattagtca ctacgctcta 240
 tcctttaatc tgtagtacc cagtgcagca aatttcctgc acttcacctg gcatgcgaag 300
 tccaagggtg aatataagct gggattccaa gtggacaatg ttttggaat ggataatgcc 360
 caggtcaaca tttctgttca gggggaagtt ccacgcactt tatcagtgtt tcgggtagag 420
 ctttcctgta ctggcaaagt agattctgaa gttatgatac taatgcagct caacttgaca 480
 gtaaattctt caaaaaattt taccgtctta aattttaaac gaaggaaaat gtgctacaaa 540

tctagagggc ccttcgaatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 600
 gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 660
 acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 720
 gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 780
 taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 840
 aagtgcgaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 900
 aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc 960
 aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1020
 gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1080
 tccgacggct ccttcttct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1140
 gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctgc acaaccacta cacgcagaag 1200
 agcctctccc tgtctccggg taaatgaact agagacgcgt gtcgacgcgg ccgcgataaa 1260
 cggccggcaa g 1271

<210> 20
 <211> 615
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> fusión de ADNc humano y secuencia codificadora de rótulo V5-his

<400> 20
 atgcgtgggg cggcgcggct ggggcggccg ggccggagtt gcctcccggg ggcccgcggc 60
 ctgagggccc cggcgcggcc gccgctgctg cttctgcttg cgctgttgcc gctgctgccc 120
 gcgcctggcg ctgccgccag cgtgagtctc tacctgagcg aggacgaggt gcgccggctg 180
 atcggctcttg atgcagaact ttattatgtg agaaatgacc ttattagtca ctacgctcta 240
 tcctttaatc tgtagtacc cagtgagaca aatttcctgc acttcacctg gcatgcgaag 300
 tccaagggtg aatataagct gggattccaa gtggacaatg ttttggcaat ggatatgccc 360
 caggtcaaca tttctgttca gggggaagtt ccacgcactt tatcagtgtt tcgggtagag 420
 ctttcctgta ctggcaaagt agattctgaa gttatgatac taatgcagct caacttgaca 480

42
72

gtaaattctt caaaaaattt taccgtctta aatttttaaac gaaggaaaat gtgctacaaa 540
aagggcgtcg aggttaagcc tacccttaac cctctcctcg gtctcgattc tacgcatcat 600
caccatcacc attga 615

<210> 21
<211> 27
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> secuencia peptídica de rótulo myc-his
<400> 21

Leu Glu Ser Arg Gly Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
1 5 10 15
Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
20 25

<210> 22
<211> 271
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> . . . secuencia de aminoácidos para el anticuerpo scFv 1B4

<400> 22

Asp Tyr Lys Asp Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
1 5 10 15
Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr
20 25 30
Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly
35 40 45
Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr
50 55 60
Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr
65 70 75 80
Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
85 90 95
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Tyr Tyr Asp Trp Phe Asp Tyr Trp Gly

73
73

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

<210> 23
<211> 876
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> secuencia nucleotidica que codifica el anticuerpo scFv 1B4

<400> 23	
atgaaacaaa gcactattgc actggcactc ttaccgttgc tcttcacccc tgttaccaa	60
gccgactaca aagatgaagt gcaattgggt cagtctggcg cggaagtga aaaaccgggc	120
agcagcgtga aagtgagctg caaagcctcc ggaggcactt ttagcagcta tgcgattagc	180
tgggtgcgcc aagcccctgg gcagggctct gagtggatgg gcggcattat tccgattttt	240
ggcacggcga actacgcgca gaagtttcag ggccgggtga ccattaccgc ggatgaaagc	300
accagcaccg cgtatatgga actgagcagc ctgcgtagcg aagatacggc cgtgtattat	360

tgcgcgcggtt cttattatga ttggtttgat tattggggcc aaggcaccct ggtgacggtt	420
agctcagcgg gtggcggttc tggcggcggt gggagcgggt gcggtgggtc tggcgggtgt	480
ggttccgata tcgtgctgac ccagccgcct tcagtgagtgc gcgcaccagg tcagcgtgtg	540
accatctcgt gtagcggcag cagcagcaac attggcagca actatgtgag ctggtaccag	600
cagttgcccgc ggacggcgcc gaaactgctg atttatgata acaaccagcg tccctcaggc	660
gtgccggatc gtttttagcgg atccaaaagc ggcaccagcg cgagccttgc gattacgggc	720
ctgcaaagcg aagacgaagc ggattattat tgccagagct gggactctat tgctcagatt	780
gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccgtt cttggccagg aattcgacta taaagatgac	840
gatgacaaaag gcgcgccgca ccatcatcac catcac	876

REIVINDICACIONES

Habiendo así especialmente descripto y determinado la naturaleza de la presente invención y la forma como la misma debe ser llevada a la práctica, se declara reivindicar como de propiedad y derecho exclusivo.

/1. Un método para modular la angiogénesis en el sitio, método que comprende provocar el suministro al sitio de una cantidad efectiva de una composición que comprende una proteína Ryk variante.

/2. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el cual la proteína Ryk variante tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a SEC. ID. NO: 2.

/3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el cual la proteína Ryk variante tiene una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 60 % idéntica a SEC. ID. NO: 2 a lo largo de por lo menos 40 residuos.

/4. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el cual la proteína Ryk variante tiene una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 70 % idéntica a SEC. ID. NO: 2 a lo largo de por lo menos 30 residuos.

/5. Un método para modular la angiogénesis en el sitio, método que comprende provocar el suministro al sitio de una cantidad efectiva de una composición que comprende una proteína Ryk variante, donde la proteína Ryk variante tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste esencialmente en SEC. ID. NO: 1, SEC. ID. NO: 2 y SEC. ID. NO: 3.

/6. Un método para modular la formación por las células de estructuras de tipo capilar, que comprende poner en contacto a las células con una cantidad biológicamente efectiva de una composición que comprende una proteína Ryk variante, donde la proteína Ryk variante tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste esencialmente en SEC. ID. NO: 1, SEC. ID. NO: 2 y SEC. ID. NO: 3.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 6 en el cual las células son células endoteliales de origen humano.

8. Una proteína que se caracteriza por tener una secuencia de aminoácidos deducida que tiene por lo menos 60 % de identidad a lo largo de 40 residuos con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste esencialmente en SEC. ID. NO: 1, SEC. ID. NO: 2 y SEC. ID. NO: 3.

9. La proteína de acuerdo con la reivindicación 8, en la cual la secuencia de aminoácidos deducida tiene por lo menos 80 % de identidad a lo largo de 50 residuos con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste esencialmente en SEC. ID. NO: 1, SEC. ID. NO: 2 y SEC. ID. NO: 3.

10. Una composición farmacéutica para modular la angiogénesis, que comprende una proteína Ryk variante, donde la proteína Ryk variante tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste esencialmente en SEC. ID. NO: 1, SEC. ID. NO: 2 y SEC. ID. NO: 3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

11. Una composición farmacéutica para modular la angiogénesis, que comprende una proteína Ryk variante, donde la proteína Ryk variante se caracteriza por tener una secuencia de aminoácidos deducida que tiene por lo menos 60 % de identidad a lo largo de 40 residuos con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste esencialmente en SEC. ID. NO: 1, SEC. ID. NO: 2 y SEC. ID. NO: 3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el cual el sitio se encuentra dentro de un paciente humano y la proteína es suministrada al sitio por medio de una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10.

✓ 13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en el cual el sitio se encuentra dentro de un paciente humano y la proteína es suministrada al sitio por medio de un proceso de terapia génica.

✓ 14. Un método para la prevención, tratamiento o mitigación de un trastorno médico en un individuo, método que comprende aportar a un individuo una fuente de una cantidad efectiva de una proteína Ryk variante, donde la proteína Ryk variante tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste esencialmente en SEC. ID. NO: 1, SEC. ID. NO: 2 y SEC. ID. NO: 3.

✓ 15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en el cual la proteína es suministrada al individuo aportando al individuo una fuente de un polinucleótido que codifica la proteína y expresa la proteína in vivo.

✓ 16. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en el cual el trastorno médico es seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer, metástasis, retinopatía diabética, degeneración macular, enfermedad cardiovascular, una herida, embarazo y un trastorno clínico que implica la angiogénesis en el aparato reproductor, incluyendo la regulación de la vascularización placentaria.

17. Un polinucleótido seleccionado entre el grupo que consiste en (a) un polinucleótido que codifica para una proteína Ryk variante, donde la proteína Ryk variante tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste esencialmente en SEC. ID. NO: 1, SEC. ID. NO: 2 y SEC. ID. NO: 3 y (b) un polinucleótido complementario de (a).

18. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 17, polinucleótido que está operativamente ligado, dentro de un vector de expresión, a un promotor.

✓ 19. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 17, polinucleótido que tiene una longitud de entre 35 y 1500 bases.

20. Un método para producir una proteína Ryk variante, donde la proteína Ryk variante tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que

consiste esencialmente en SEC. ID. NO: 1, SEC. ID. NO: 2 y SEC. ID. NO 3, que comprende los pasos de:

(a) introducir un vector de expresión apto para expresar la proteína Ryk variante en una célula con capacidad para expresar la proteína Ryk variante,

(b) cultivar las células resultantes del paso (a) en condiciones adecuadas para permitir que las células expresen la proteína Ryk variante y

(c) recuperar la proteína Ryk variante del resultado del paso (b).

21. Un anticuerpo contra una proteína de acuerdo con la reivindicación 8.

22. Un anticuerpo contra una proteína de acuerdo con la reivindicación 27.

23. Un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos identificada en SEC. ID. NO: 22.

24. Un método para modular la angiogénesis en un sitio, método que comprende provocar el suministro al sitio de una cantidad efectiva de una composición que comprende el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 27.

25. Un método para diagnosticar una enfermedad o trastorno médico o susceptibilidad a una enfermedad o trastorno médico en un mamífero, enfermedad o trastorno médico que se relaciona con la expresión inadecuada o excesiva de una proteína Ryk variante, donde la proteína Ryk variante tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste esencialmente en SEC. ID. NO: 1, SEC. ID. NO: 2 y SEC. ID. NO 3, método que comprende los siguientes pasos:

(a) determinar el nivel de expresión de dicha proteína en una muestra obtenida del mamífero y

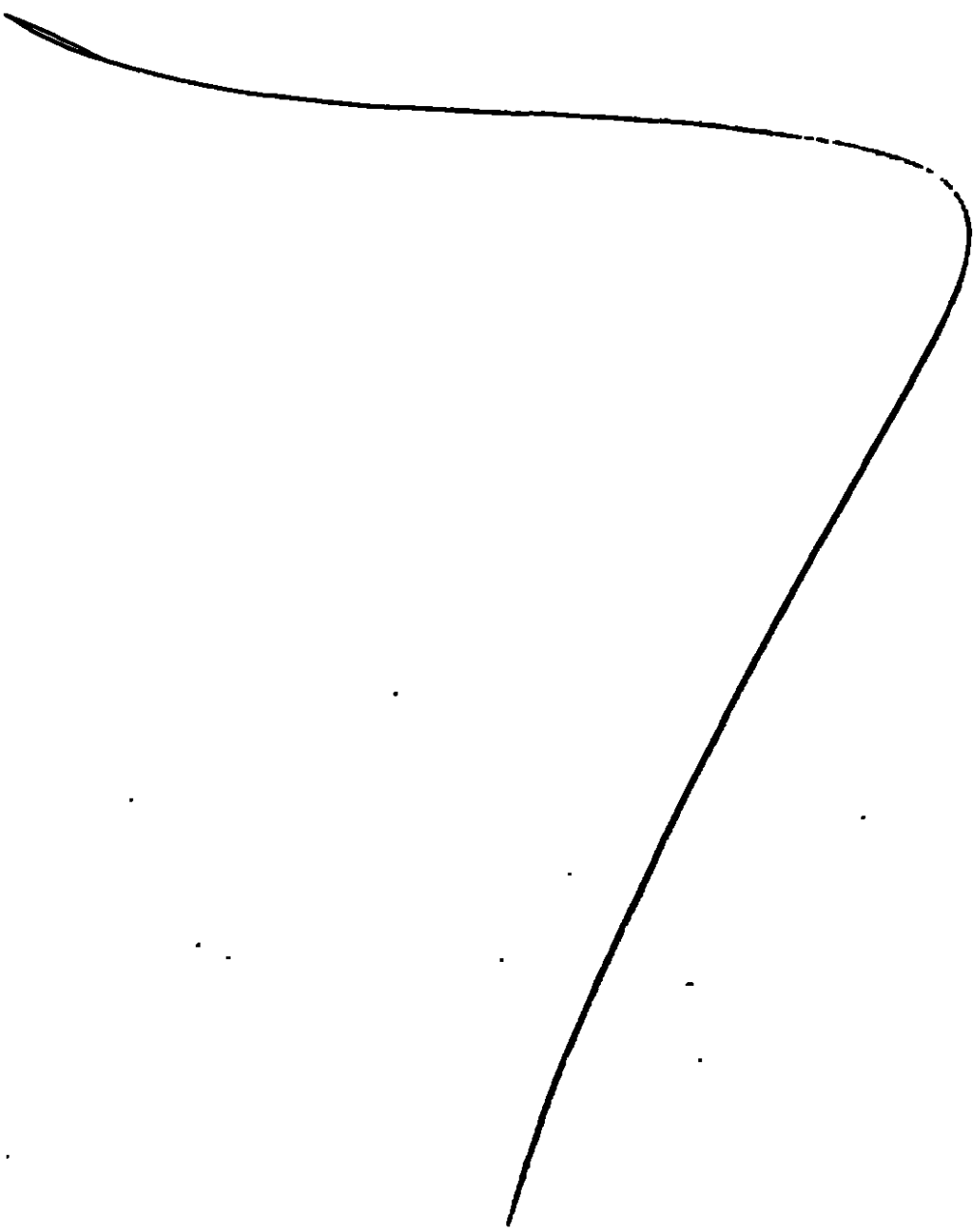
(b) comparar el nivel de expresión de dicha proteína con un patrón para efectuar un diagnóstico.

26. El método de acuerdo con la reivindicación 25, en el cual el trastorno médico es seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer, metástasis,

retinopatía diabética, degeneración macular, enfermedad cardiovascular, una herida, embarazo y un trastorno clínico que implica la angiogénesis en el aparato reproductor.

27. Una proteína que se caracteriza por tener una secuencia de aminoácidos deducida seleccionada entre el grupo que consiste esencialmente en SEC. ID. NO: 1, SEC. ID. NO: 2 y SEC. ID. NO 3.

p. BAYER CORPORATION



RESUMEN

Se encontró que la proteína Ryk tenía una novedosa actividad en la regulación de la angiogénesis. Se construyeron nuevas proteínas Ryk variantes que son ventajosas para modular la actividad formadora de capilares de las células endoteliales. Las proteínas Ryk variantes pueden ser utilizadas como agentes terapéuticos en enfermedades tales como el cáncer, la cicatrización de heridas, las retinopatías diabéticas, la degeneración macular y las enfermedades cardiovasculares, así como otras enfermedades o trastornos clínicos en la que la angiogénesis está involucrada en la causa o el tratamiento de la enfermedad.

FIG._1

SEQ ID NO:1:

APAPRPPELQSASAGPSVSLYLSEDEVRRRLIGLDAELYVVRNDLISHYALSFNLLVPSETNFLHFTWHAKS
KVEYKLGFDNVLANMDMPQVNI SVQGEVPRTL SVFRVELSCTGKVDSEVMILMQLNLTVNSSKNFTVLNF
KRRKMCYKKLEEVKTSALDKNTSRTIYDPVHAAPTSTRVFYISVGVC

SEQ ID NO:14:

ATGCGTGGGGCGGCGGGCTGGGGCGGCCGGGCGGAGTTGCCTCCCGGGGGCCCGGGCCTGAGGGCCCC
GCCGCCGCCGCGCTGCTGCTTCTGCTTGGCGCTGTTGCCGCTGCTGCCCGCGCCTGGCGCTGCCGCCGCC
CCGCCCCGGGCCCCCGGAGCTGCAGTCGGCTTCCGCGGGGGCCAGCGTGAGTCTCTACCTGAGCGAGGAC
GAGGTGGCCCGGCTGATCGGTCTTGATGCAGAACTTTATTATGTGAGAAATGACCTTATTAGTCACTACGC
TCTATCCTTTAATCTGTTAGTACCCAGTGAGACAAATTTCTGCACTTCACTGGCATGCGAAGTCCAAGG
TTGAATATAAGCTGGGATTCGAAGTGGACAATGTTTTGGCAATGGATATGCCCCAGGTCAACATTTCTGTT
CAGGGGGAAGTTCCACGCACTTTATCAGTGTTTCGGGTAGAGCTTTCCTGTACTGGCAAAGTAGATTCTGA
AGTTATGATACTAATGCAGCTCAACTTGACAGTAAATTCTTCAAAAAATTTACCGTCTTAAATTTTAAAC
GAAGGAAAATGTGCTACAAAAAAGTTGAAGAAGTAAAACTTCAGCCTTGGACAAAAACACTAGCAGAACT
ATTTATGATCCTGTACATGCAGCTCCAACCACTTCTACGCGTGTTTATATTAGTGTAGGGGTTTGTG
T

FIG. 2**SEQ ID NO:2:**

APAPRPPELQSASAGPSVSLYLSEDEVRRLLIGLDAELYVVRNDLISHYALSFNLLVPSETNFLHFTWHAKS
KVEYKLGQVDNVLAMDPQVNI SVQGEVPRTLSVFRVELSCTGKVDSEVMILMQLNLTVNSSKNFTVLNF
KRRKMCYKKLEEVKTSALDKNTSRTIYDPVHAAPTSTR

SEQ ID NO:15:

ATGCGTGGGGCGGGCGGGCTGGGGCGGCCGGGCCGGAGTTGCCTCCCGGGGGCCCGGGCCTGAGGGCCCC
GCCGCCGCCGCCGCTGCTGCTTCTGCTTGCGCTGTTGCCGCTGCTGCCCGCGCCTGGCGCTGCCGCCGCC
CCGCCCGCGGCCCGGGAGCTGCAGTCGGCTTCCGCGGGGCCAGCGTGAGTCTCTACCTGAGCGAGGAC
GAGGTGCGCCGGCTGATCGGTCTTGATGCAGAACTTTATTATGTGAGAAATGACCTTATTAGTCACTACGC
TCTATCCTTTAATCTGTAGTACCCAGTGAGACAAATTTCTGCACTTCACCTGGCATGCGAAGTCCAAGG
TTGAATATAAGCTGGGATTCCAAGTGGACAATGTTTTGGCAATGGATATGCCCCAGGTCAACATTTCTGTT
CAGGGGGAAGTTCCACGCACTTTATCAGTGTTTCGGGTAGAGCTTTCCTGTACTGGCAAAGTAGATTCTGA
AGTTATGATACTAATGCAGCTCAACTTGACAGTAAATTTTCAAAAATTTTACCGTCTTAAATTTTAAAC
GAAGGAAAATGTGCTACAAAAAATTGAAGAAGTAAAACTTCAGCCTTGGACAAAACACTAGCAGAACT
ATTTATGATCCTGTACATGCAGCTCCAACCACTTCTACGCGT

FIG. 3**SEQ ID NO:3:**

MRGAARLGRPGRSCLPGARGLRAPPPPLLLLLALLPLLPAAGAAASVSLYLSEDEVRRRL
IGLDAELYVVRNDLISHYALSFNLLVPSETNFLHFTWHAKSKVEYKLGQVDNVLAMDMPP
QVNISVQGEVPRTL SVFRVELSCTGKVDSEVMILMQLNLTVNSSKNFTVLNFKRRKMCYK

SEQ ID NO:16:

ATGCGTGGGGCGGCGCGGCTGGGGCGGCGCGGCGGGAGTTGCCTCCCGGGGGCCCGCGGC
CTGAGGGCCCCGCCGCCGCCGCTGCTGCTTCTGCTTGCGCTGTTGCCGCTGCTGCCC
GCGCCTGGCGCTGCCGCCAGCGTGAGTCTCTACCTGAGCGAGGACGAGGTGCGCCGGCTG
ATCGGTCTTGATGCAGAACTTTATTATGTGAGAAATGACCTTATTAGTCACTACGCTCTA
TCCTTTAATCTGTTAGTACCCAGTGAGACAAATTTCTGCACTTCACCTGGCATGCGAAG
TCCAAGGTTGAATATAAGCTGGGATTCGAAGTGGACAATGTTTTGGCAATGGATATGCCC
CAGGTCAACATTTCTGTTCAAGGGGGAAGTTCACGCACTTTATCAGTGTTTCGGGTAGAG
CTTTCCTGTACTGGCAAAGTAGATTCTGAAGTTATGATACTAATGCAGCTCAACTTGACA
GTAAATTCTTCAAAAAATTTTACCGTCTTAAATTTTAAACGAAGGAAAATGTGCTACAAA
TGA

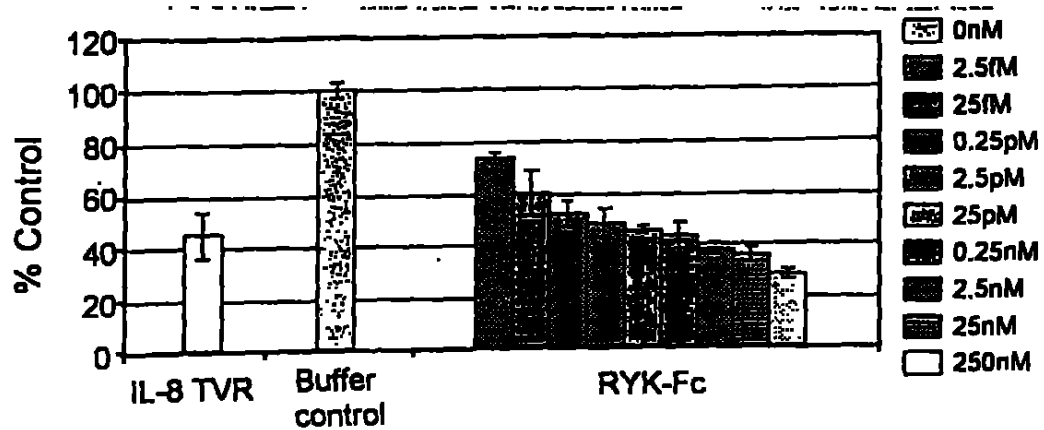


FIG. 4A

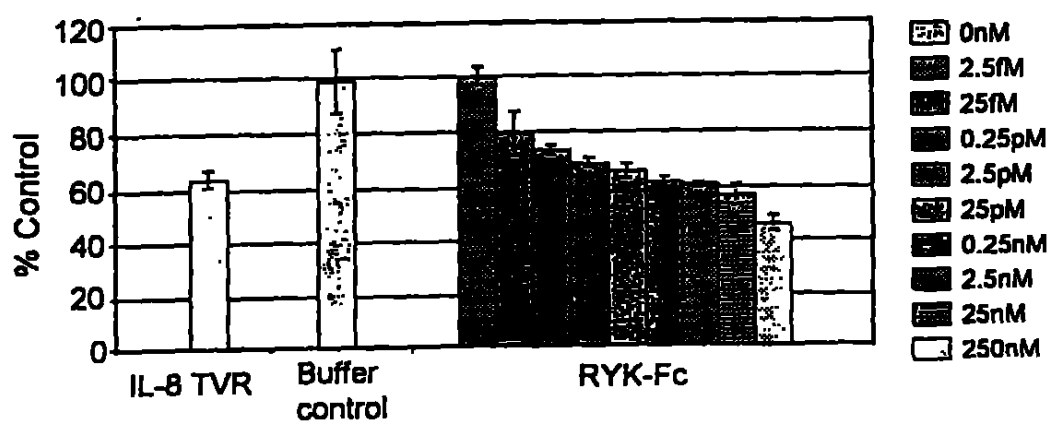


FIG. 4B

85

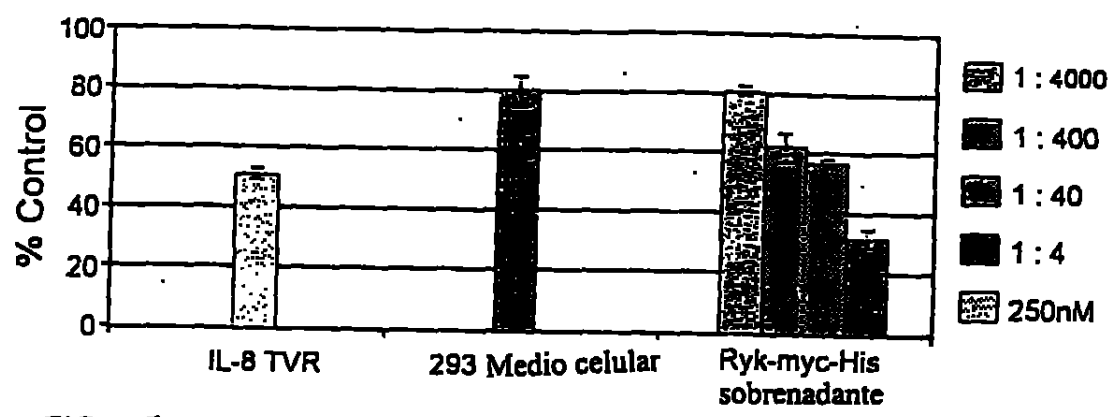


FIG._5

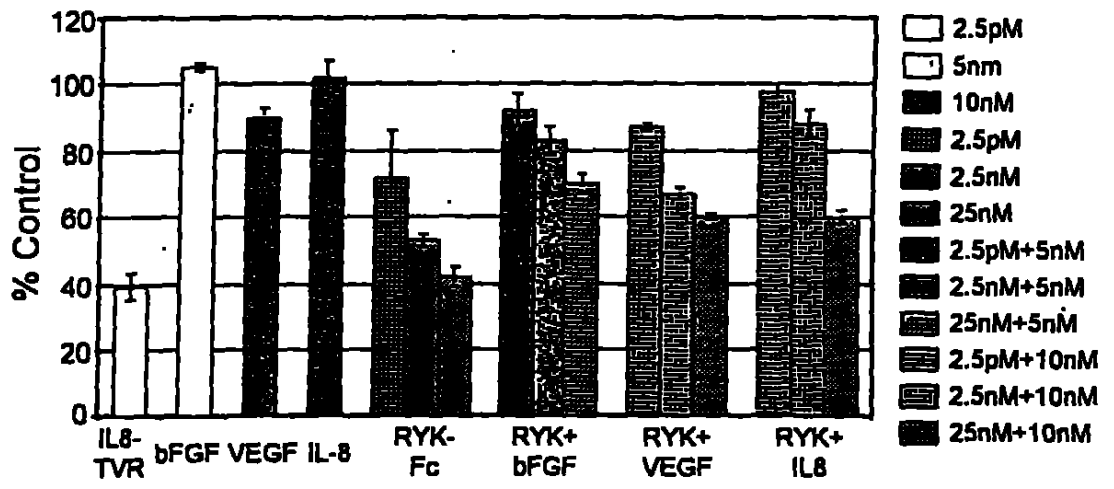
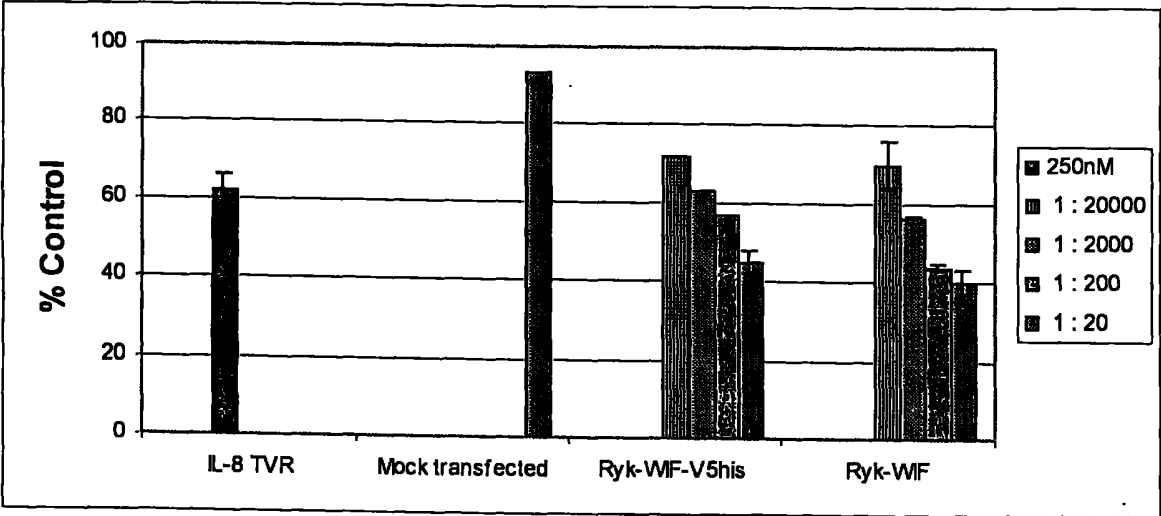
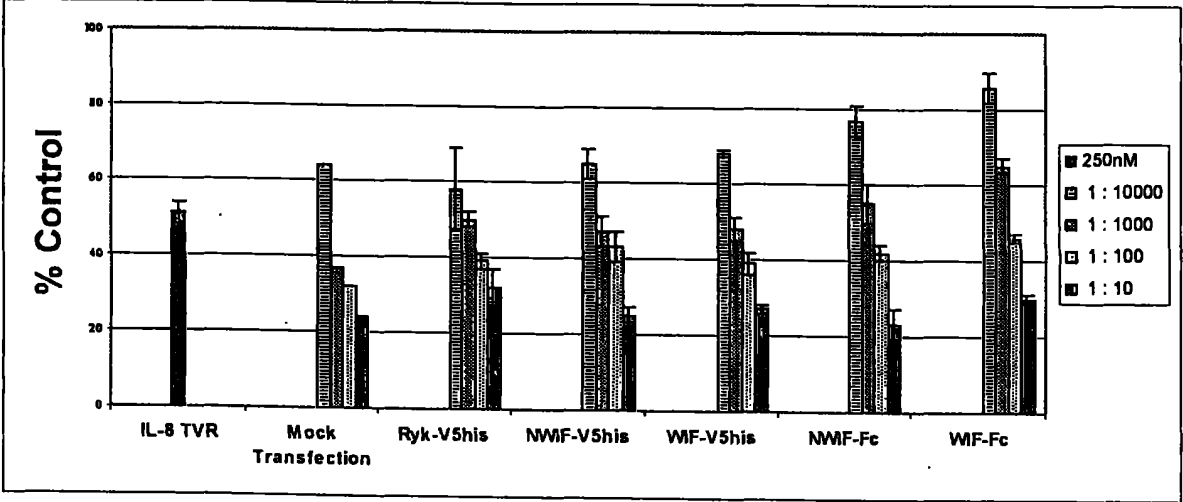


FIG. 6

Fig._7A



Fig_7B



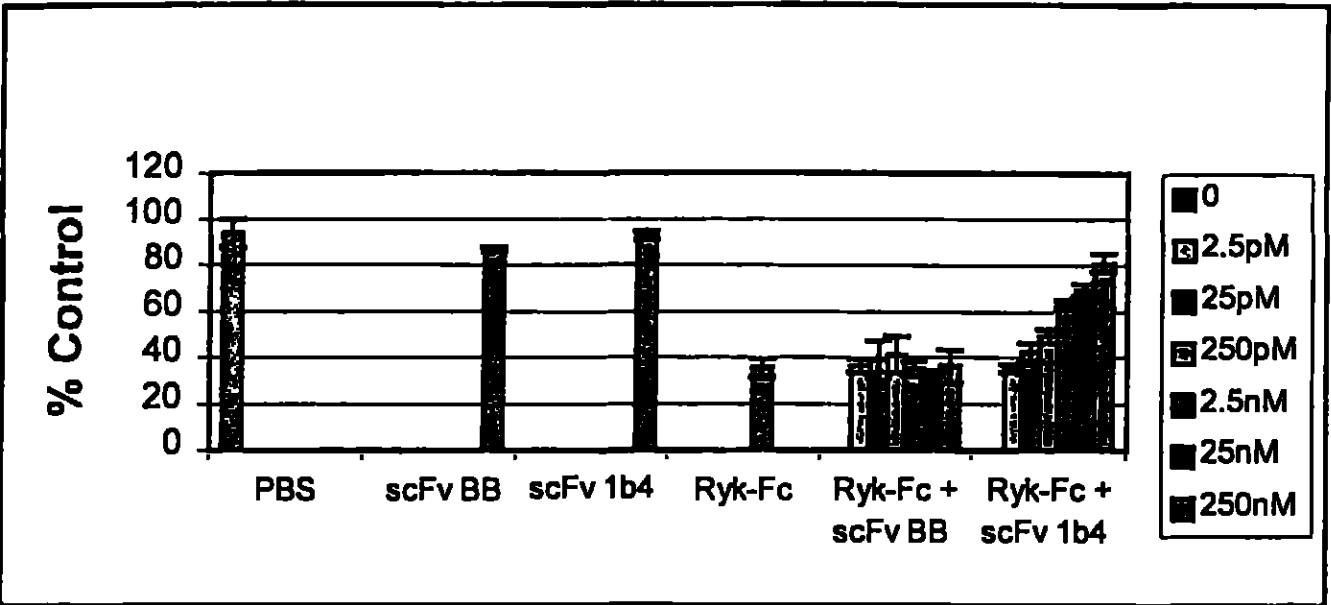


FIG._8

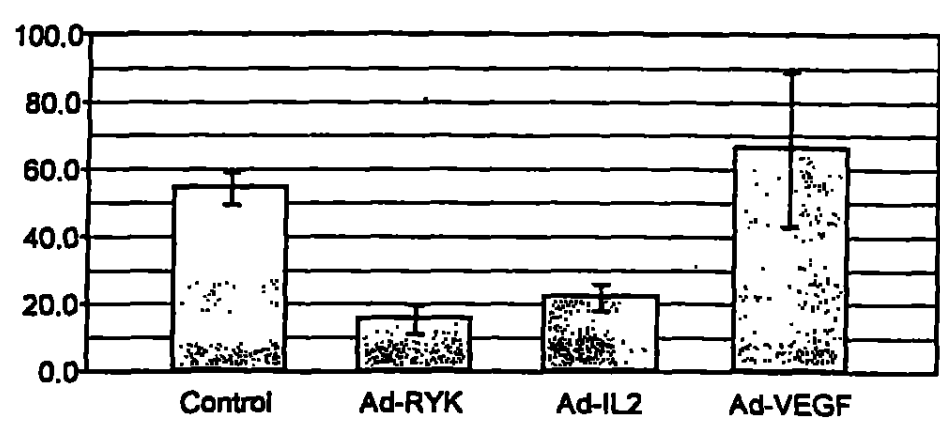


FIG. 9

FIG._10

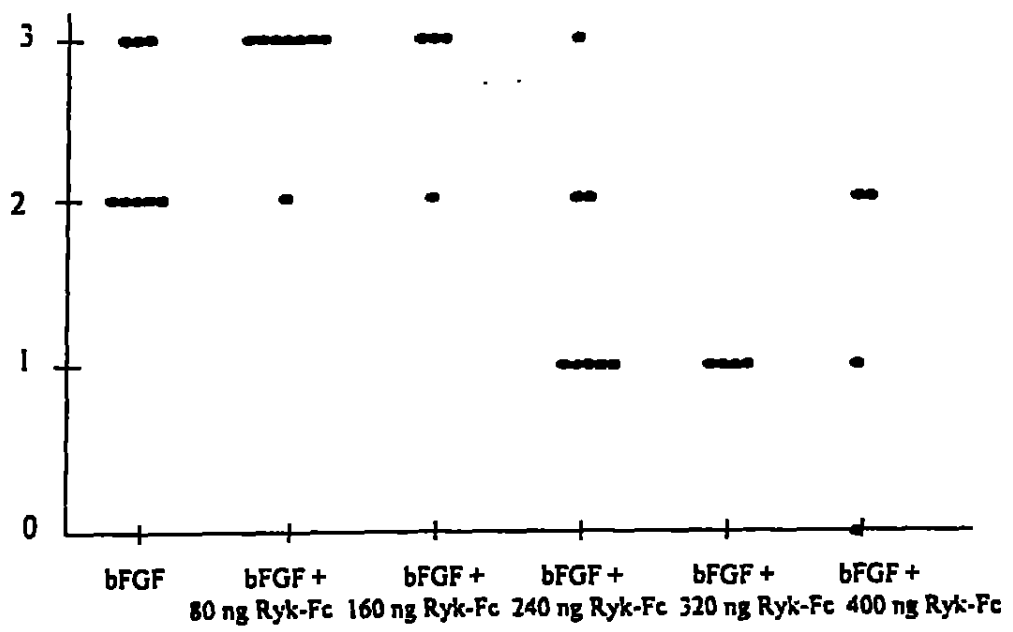


Figura xa: Grados de angiogenesis fueron calificados a ciegas por dos individuos utilizando puntos de referencia como se ilustró en la figura 4b. Cada uno de los círculos corresponde a única cornea de rata y ya sea 4 u 8 córneas fueron probadas en cada dosis como se indicó .

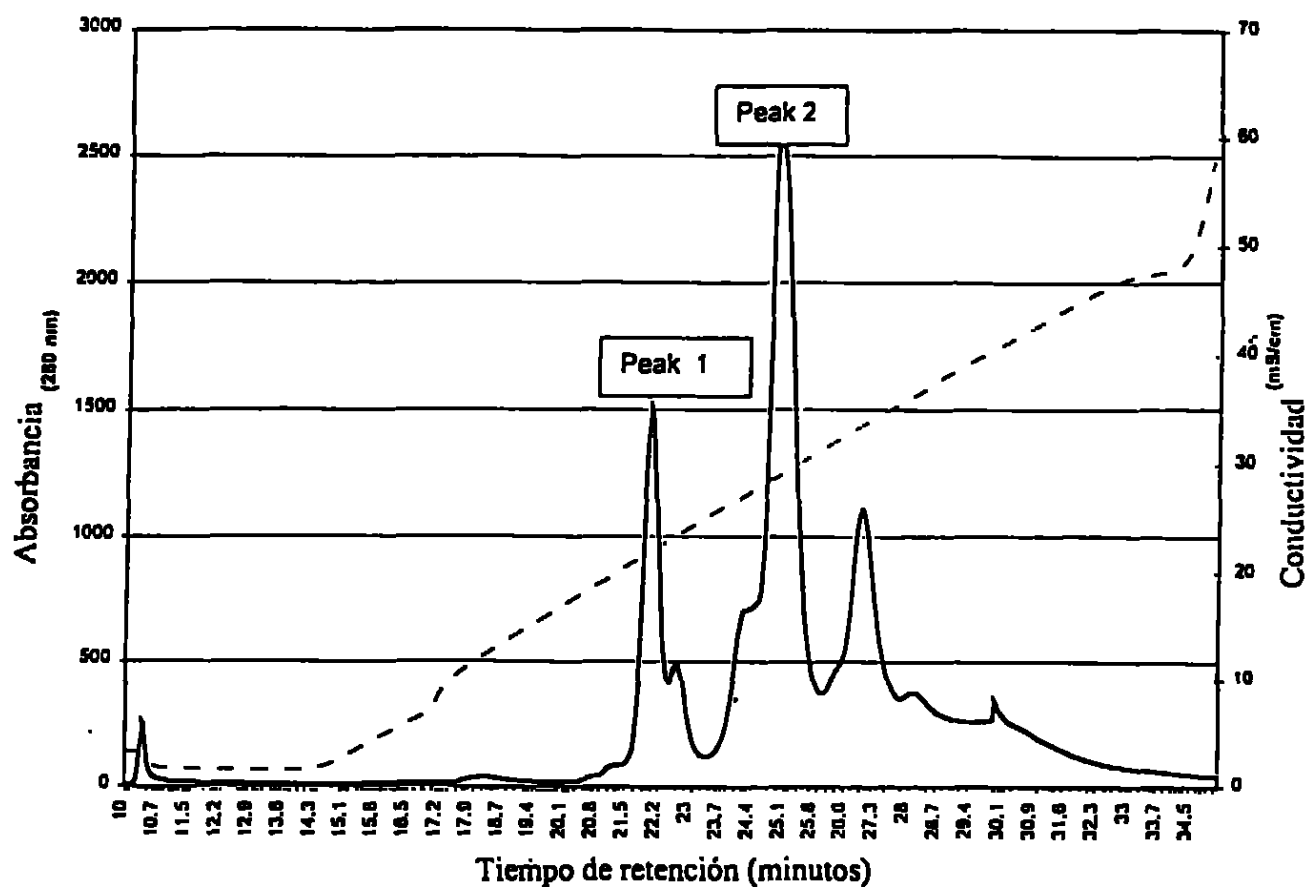


FIG. 11

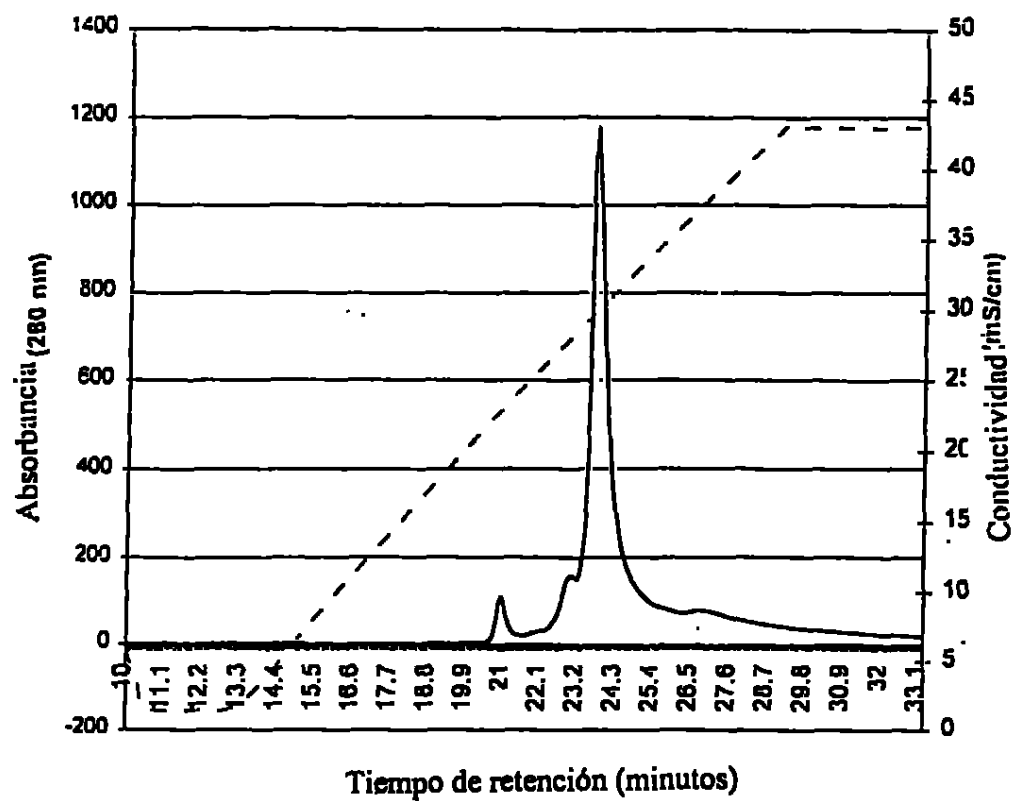


FIG. 12

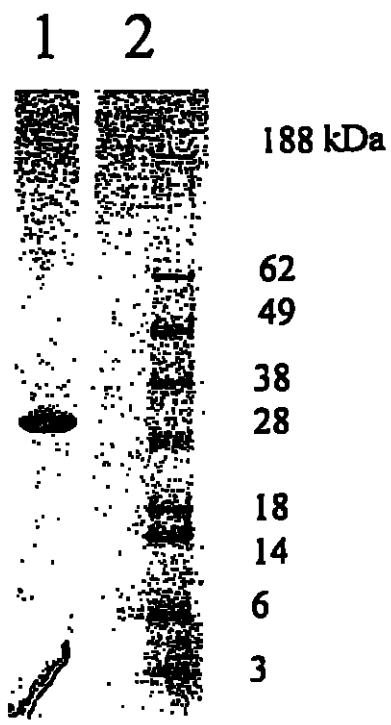


FIG._13

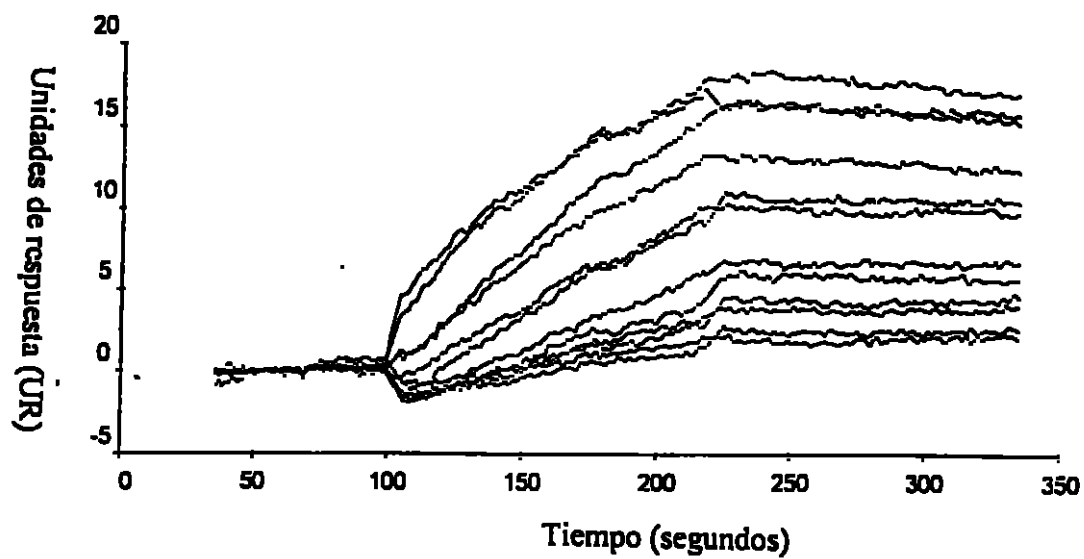


FIG._14



CONSULADO DE C OLOMBIA
WASHINGTON, D.C.



96

9397

5786

No. 1040

EL CONSULADO DE COLOMBIA

CERTIFICA:

Que es auténtica la firma de PATRICK O. HATCHETT.
quien el día 19 DE ABRIL DEL 2000
desempeñaba las funciones de OFICIAL DE AUTENTICACIONES DEPARTAMENTO DE ESTADO
la cual aparece al pie de los documentos anexos relacionados con REPRESENTACION Y PODER.

Dado en Washington, D.C. a los VEINTICINCO (25) días del mes de
ABRIL. del año dos mil (2000)

Pagado Impuesto de Timbre

Pagado Derecho Consular

Total

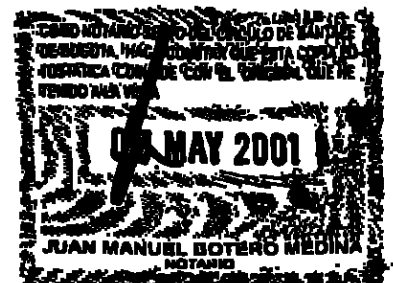
7=
15=
22=

JAQUELINE ESPITIA ARIAS
Vicecónsul

(El Consulado no asume ninguna
responsabilidad por el contenido de los
documentos anexos)

STATE OF CONNECTICUT
COUNTY OF New Haven

ss. West Haven



I, Deborah Collins Asst., Clerk of the Town of West Haven

in said County, do hereby certify that Elaine Porter
by and before whom the foregoing (or annexed) acknowledgment was taken, was at the time of taking the same
a notary public (or other officer) residing (or authorized to act) in said County, and was authorized by the laws
of said State to take and certify acknowledgments in said State, and, further, that I believe that the signature to
the certificate of acknowledgment is genuine.

IN TESTIMONY WHEREOF, I have hereunto set my hand and affixed the seal of the State and Town this

13th day of April 19 2000

Asst. Town Clerk

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2000 JUN -7 A 9 43

JEFE DE RELACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE DEFENSA
EXTERIORES

276352

MAQUINARIA
COMUNICACIONES
RADIOFONIA
LASER

COMO NOTARIO DEL CIRCULO DE NOTARIOS
DE BOGOTA, MANO CONSTA QUE ESTE
DOCUMENTO CONFORME CON EL ORIGINAL QUE
TERCEO ALA NOTIA
07 MAY 2001
JUAN MANUEL BOPERO MEDINA
NOTARIO

00034295-4
United States of America

9597
5724
97



DEPARTMENT OF STATE

To all to whom these presents shall come, Greetings:



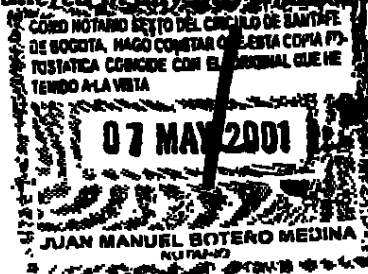
I Certify That the document hereunto annexed is under the Seal of the State(s) of Connecticut, and that such Seal(s) is/are entitled to full faith and credit.*

In testimony whereof, I, Strobe Talbott, Acting Secretary of State, have hereunto caused the seal of the Department of State to be affixed and my name subscribed by the Assistant Authentication Officer, of the said Department, at the city of Washington, in the District of Columbia, this nineteenth day of April, 2000..

Strobe Talbott
Acting Secretary of State
By Peter J. H. [Signature]
Assistant Authentication Officer,
Department of State

Issued pursuant to CDDIV, State of
Sept. 13, 1789, 1 Stat. 68-69; 22
USC 2657; 22 USC 2651a; 5 USC
301; 28 USC 1733 et. seq.; 8 USC
1443(f); RULE 44 Federal Rules of
Civil Procedure.

*For the contents of the annexed document, the Department assumes no responsibility
This certificate is not valid if it is removed or altered in any way whatsoever



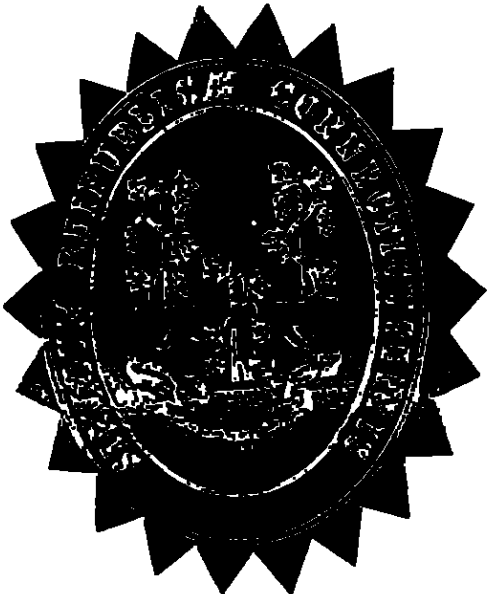


88

**STATE OF CONNECTICUT
OFFICE OF THE SECRETARY OF THE STATE**

I, **SUSAN BYSIEWICZ**, Secretary of the State of Connecticut and keeper of the seal thereof,

DO HEREBY CERTIFY, that **DEBORAH COLLINS**, was duly elected or appointed to the office of **ASSISTANT CITY AND TOWN CLERK**, for the town of **WEST HAVEN** in the County of **NEW HAVEN** in said state, for the term of **DECEMBER 5, 1999** to **DECEMBER 2, 2001**;

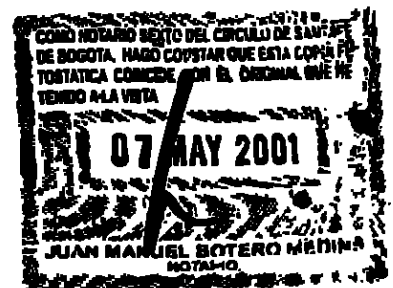


and that to his/her acts and attestations as such, full faith and credit are and ought to be given in and out of Court.

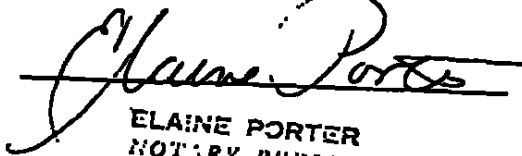
In Testimony Whereof, I have hereunto set my hand and affixed the Great Seal of the State of Connecticut, at Hartford, on April 14, 2000.

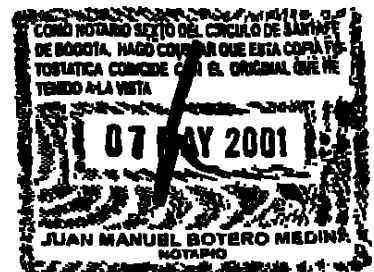
Susan Bysiewicz

Secretary of the State



Subscribed and sworn to before me this 10th day of April, 2000.


ELAINE PORTER
NOTARY PUBLIC
MY COMMISSION EXPIRES JUNE 30, 2001





CAVELIER

ABOGADOS

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTÁ, COLOMBIA

For patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, slogans.

Para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, lemas comerciales.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned/Yo (nosotros), abajo firmado (s)

BAYER CORPORATION ✓

of/domiciliado (s) en 100 BAYER ROAD, PITTSBURGH, PENNSYLVANIA 15205,
UNITED STATES OF AMERICA

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31829; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1° del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o al tercero el segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, trasiego, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir, este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistirse, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiales.

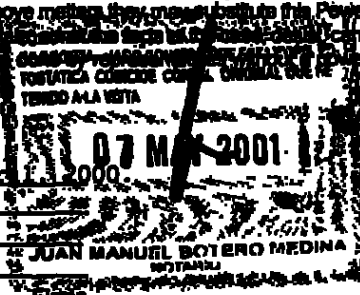
In due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31829; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciled at Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact of its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court. In all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the process, cancel, receive, resign, and ratify acts done by official agents.

Given and signed this/Dado y firmado hoy 11th day of April, 2000.

In/at West Haven, Connecticut, United States of America

Signature:
Name: Juan Manuel Botero Medina
Title: Vice President, Patents and Licensing



© CAVELIER ABOGADOS
(Minuta N° 12.1.1.2.6.USA)

Subscribed and sworn to before me this 11th day of April, 2000.

ELAINE P. PORTER
NOTARY PUBLIC
MY COMMISSION EXPIRES JUNE 30, 2001

CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUO)

A los _____ días del mes de _____ de 19____
ante mí, Notario Público de _____
compareció(eron) personalmente _____

a quien(es) doy fe de conocer y me consta que es(son) la(s)
persona(s) firmante(s) del documento que precede, y quien(es)
tiene(n) capacidad legal para otorgarlo.

Notario Público Notary Public

* Los documentos deben identificarse con fecha y origen.

CERTIFICADO (PARA SOCIEDAD)

De conformidad con las leyes de Estados Unidos de América, yo
soy el funcionario que tiene la facultad legal de certificar acerca
de la existencia y representación de la Sociedad/Compañía.

denominada BAYER CORPORATION

Certifico:

1. Que he visto los siguientes documentos:

Ver ABATO

2. Que dichos documentos prueban lo siguiente:

2.1. Que BAYER CORPORATION

es una Sociedad/Compañía legalmente constituida y existente
de acuerdo con las leyes de Estado de Indiana,

Estados Unidos de América

2.2. Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es

100 Bayer Road, Pittsburgh, Pennsylvania
15205, Estados Unidos de América

2.3. Que el objeto de la Sociedad/Compañía es el que se otorga presente poder
están comprendidos dentro del objeto social de la mencionada
Sociedad/Compañía

2.4. Que el(los) Jeffrey M. Greenman

está(n) autorizado(s) Jeffrey M. Greenman presente Poder.

Ciudad: West Haven

Estado: Connecticut

Hoy 12 Abril de 2000

Signature: _____

Nombre del funcionario:

Cargo:

Firma: _____

* Los documentos deben identificarse con fecha y origen.

1. Articles of Incorporation fechados 6 MARZO, 1996 en
Indianapolis, Indiana - E.U.U.

2. Articles of Merger de Bayer U.S.A. y Bayer Corporation

4 Miles Financial Services a Miles Inc. y

cambio de nombre a Bayer Corporation, certificado

por el Secretario de Estado de Indiana en Indianapolis,

© CAVELIER ABOGADOS

(Minute Nº12.1.1.2.9USA)

3. Estatutos de Bayer Corporation de 10 Abril 1995 Bylaws of Bayer Corporation effective as of April 1, 1995.

4. Resolución de la Junta Directiva de Miles Inc.

Ahora Bayer Corporation de una reunión de la Junta

fechado 22 nov. 1991 autorizando funcionarios para

firmar documentos legales en nombre de la

Sociedad

NOTARIAL CERTIFICATE (INDIVIDUAL)

On this _____ day of _____, 19____
before me, a Notary Public of _____
personally appeared _____

to me known, and known to me to be the person(s) who executed that
foregoing document, and who has(have) legal capacity to execute it.

Notary Public

* Documents must be identified with date and origin.

CERTIFICATE (FOR CORPORATION)

According to the laws of the United States of America, I am the
official who has the legal function to certify about the existence and
representation of Corporation/Company

named BAYER CORPORATION

I Certify:

1. That I have seen the following documents:

- See below -

2. That the above documents duly prove the following:

2.1. That BAYER CORPORATION

is a Corporation/Company legally constituted and in existence
in accordance with the laws of the State of Indiana,

United States of America

2.2. That the domicile of said Corporation/Company is

100 Bayer Road, Pittsburgh, Pennsylvania 15205,
United States of America

2.3. That the purpose of purposes for which the present Power of
Attorney is granted are comprised within the corporation purposes set
forth in the charter of the mentioned Corporation/Company.

2.4. That Mr.(Messrs.) Jeffrey M. Greenman

is(are) authorized to grant the present Power of Attorney.

City West Haven

State Connecticut

This 12th day of April, 2000.

Signature: _____

Name of Attesting Officer: George J. Lykos

Position held: Vice President, Assistant General
Counsel, and Assistant Secretary

Signature: _____

* Documents must be identified with date and origin.

1. Articles of Incorporation of Miles Inc., filed and approved 6 March 1996,
Indianapolis, Indiana, U.S.A.

2. Articles of Merger of Bayer U.S.A. Inc., and Bayer Corporation,

and Miles Financial Services Inc., into Miles Inc., and change

of the name of the survivor to Bayer Corporation; certified by the

Secretary of State of the State of Indiana, at Indianapolis, Indiana,

10 April 1995.

3. Bylaws of Bayer Corporation effective as of April 1, 1995.

4. Resolution of the Board of Directors of Miles Inc., now Bayer Corporation,

at a meeting of the Board held 22 November 1991, authorizing corporate

officers to execute legal instruments on behalf of the corporation.

firmar documentos legales en nombre de la

Sociedad

TRADUCCIÓN OFICIAL N° 0806001 del inglés al español de los sellos y autenticaciones que aparecen en el documento de poder otorgado por BAYER CORPORATION, preparada por Jaime Armando Garavito Burgos, Traductor Oficial debidamente reconocido por el Ministerio de Relaciones Exteriores y aprobado por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia mediante Resolución N° 034 de enero 11 de 1983

Documento escrito en inglés y español por medio del cual BAYER CORPORATION, otorga poder a favor de EMILIO FERRERO, GONZALO PERDOMO, LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ y GERMÁN CAVELIER. Dado y firmado el 11 de abril del 2000 en West Haven, Connecticut, Estados Unidos de América (firmado) Jeffrey M. Greeman

Nombre: Jeffrey M. Greenman

Cargo: Vicepresidente, Patentes y Licenciamiento

Suscrito y juramentado en mi presencia hoy 11 de abril del

2000. (firmado) ELAINE PORTER, Notario Público

(Sello notarial en tinta y sello notarial en relieve)

CERTIFICACIÓN NOTARIAL (SOCIEDAD) en inglés

referente a la existencia legal de la sociedad BAYER

CORPORATION y su representante autorizado Jeffrey M. Greenman,

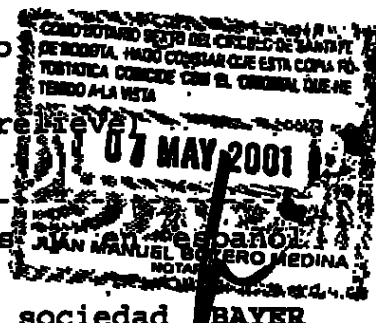
expedida el 12 de abril del 2000 en West Haven, Connecticut,

Estados Unidos de América

Suscrito y juramentado en mi presencia hoy 10 de abril del

2000. (firmado) ELAINE PORTER, Notario Público

(Sello notarial en tinta y sello notarial en relieve)



102

(Aparece escudo impreso)

ESTADO DE CONNECTICUT

}

declaración juramentada

West Haven

CONDADO DE New Haven

Yo, Deborah Collins, Subsecretario de la ciudad de West Haven en dicho condado, por medio del presente certifico que Elaine Porter por quien ante quien se hizo el reconocimiento anterior (anexo), era en el momento de hacerlo un notario público (u otro funcionario) residente (o autorizado para actuar) en dicho Condado y estaba autorizado por las leyes de dicho Estado para hacer y certificar reconocimientos en dicho Estado. Certifico además que creo que la firma en dicho certificado de reconocimiento es auténtica.

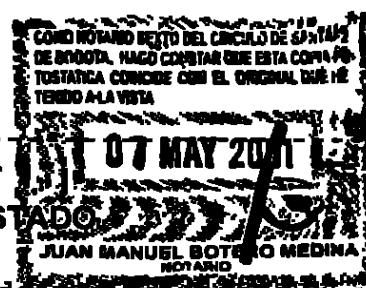
EN TESTIMONIO DE LO CUAL, he estampado mi firma y el sello del estado y ciudad hoy 13 de abril del 2000.

(firmado) Deborah Collins, Subsecretaria del Poblado

(Aparece sello en relieve)

ADINCS FORMATO 223

ESTADO DE CONNECTICUT
OFICINA DEL SECRETARIO DE ESTADO



Yo, SUSAN BYSIEWICZ, Secretario del Estado de Connecticut y guardián de su sello,

POR MEDIO DEL PRESENTE CERTIFICO que DEBORAH COLLINS, fue debidamente electa o nombrada al cargo de SUBSECRETARIA DE CIUDAD Y DE PUEBLO, para la población de WEST HAVEN en el Condado de NEW HAVEN en dicho estado, por el período comprendido entre DICIEMBRE 5, 1999 y DICIEMBRE 2, 2001;

(Aparece adherido sello dorado)

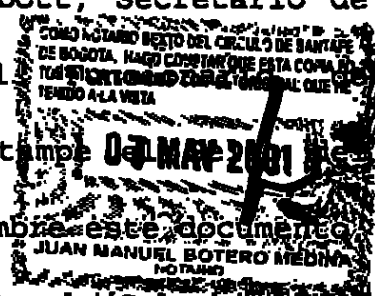
y que se da y deberá darse plena fe y crédito a sus actos y testimonios como tales, tanto procesal como extraprocesalmente. En testimonio de lo cual, he estampado mi firma y el Gran Sello del Estado de Connecticut en Hartford el 14 de abril del 2000.
(firmado) Susan Bysiewicz, Secretaria del Estado

N° 00034295-4
Estados Unidos de America
(Aparece escudo)
DEPARTAMENTO DE ESTADO

A todos aquellos a quienes los presentes llegaren, Saludos:

Certifico que el documento adjunto al presente se encuentra bajo el(los) Sello(s) del Secretario de Estado del Estado de Connecticut y que debe darse plena fe y crédito a dicho(s) Sello(s).*

En testimonio de lo cual, yo, Strobe Talbott, Secretario de Estado Encargado, he hecho que el
Autenticaciones de dicho Departamento estampe
Departamento de Estado y suscriba en mi nombre este documento
en la ciudad de Washington, en el Distrito de Columbia, hoy diecinueve de abril del 2000.



(firmado) Strobe Talbott, Secretario de Estado
(Firmado) Patrick O. Hatchett, Funcionario Asistente de Autenticaciones Departamento de Estado.

*El Departamento no asume ninguna responsabilidad por el contenido del documento anexo.

Este certificado no es válido si se le remueve o altera en cualquier forma.

(Sello en relieve del Departamento de Estado de los Estados Unidos de América)

(El formulario detalla las disposiciones legales bajo las cuales fue emitido e impreso)

N° 1040. EL CONSULADO DE COLOMBIA en Washington, D.C., Estados Unidos de América, certifica las funciones y firma de PATRICK O. HATCHETT, el 25 de abril del 2000. Pagado impuesto de timbre y derechos consulares. (firmado) JAQUELINE ESPITIA ARIAS, Vicecónsul

EL MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES en Santa Fe de Bogotá, D.C. certifica la firma y las funciones de JAQUELINE ESPITIA ARIAS, el 07 de junio del 2000. N° 276352 (firmado) Jefe de Legalizaciones.



Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en los archivos de esta oficina para su confrontación y a la cual me remito.

Santa Fe de Bogotá, D.C., junio 08 del 2000

Jaime A. Garavito B.
JAIME A. GARAVITO B.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
Ene 034 de Enero 11 de 1983
MINISTERIO DE JUSTICIA

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

278511

JAIME GARAYITO
CUYA FIRMA APARECE EN
DOCUMENTOS QUE SE ENVIAN
A LOS TRIBUNALES INDICADOS.

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

400 JUN -91 P 12:58

SECRETARÍA DE RELACIONES
EXTERIORES DE BOGOTÁ D.C.

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE
BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LAS ANTERIORES (IR-
MA(S) PUESTA(S) POR

Jaime Garayito

SANTAFE DE BOGOTA 09 JUN 2000

NOTARIA SEXTA
PABLO MEIDEZ
BARAJAS
Circulo Sexto Encargado

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE ESTA COPIA
FOTOGRAFICA COINCIDE CON ORIGINAL QUE HE
VISTO A LA VISTA

07 MAY 2001

JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO

Folios 105 y 106

ta y el

Folio 107 extracto publicacion

Marzo 4/03
Liz

MA 394393

198
105

THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

United States Patent and Trademark Office

April 12, 2001

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM THE RECORDS OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE OF THOSE PAPERS OF THE BELOW IDENTIFIED PATENT APPLICATION THAT MET THE REQUIREMENTS TO BE GRANTED A FILING DATE UNDER 35 USC 111.

APPLICATION NUMBER: 09/568,783

FILING DATE: May 10, 2000



By Authority of the
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS

P. R. GRANT
Certifying Officer

05-12-00

Patent
MSB-7266

A 194
Box-Seq 06

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicants:

STEVE ROCZNIAK
NATHALIE A. DUBOIS-STRINGFELLOW
ALYA ZOLOTOREV

Serial No.: UNASSIGNED

Filed: UNASSIGNED

Title: METHOD OF REGULATING ANGIOGENESIS
USING RYK PROTEIN

Examiner: UNASSIGNED

Group Art Unit: UNASSIGNED

Atty. Docket No.: MSB-7266

BOX: PATENT APPLICATION
Commissioner of Patents and Trademarks
Washington, D.C. 20231

CERTIFICATE OF EXPRESS MAIL

Sir:

,"Express Mail" Mailing Label Number: EL547624838 US

Date of Deposit: May 10, 2000

I hereby certify that the enclosed Patent Application, Abstract, Title Page, Claims, Drawings, Sequence Listing, 3.5 inch diskette complying with 37 CFR 1.821 et seq, Assignment with Request for Recordation, Declaration, Transmittal Letter, Certificate of Express Mailing are being deposited with the United States Postal Service "Express Mail Post Office to Addressee" service under 37 CFR § 1.10 on the date indicated above and is addressed to the Commissioner of Patents and Trademarks, Washington, D.C. 20231.

Michael J. Beck
Michael J. Beck

May 10, 2000
Date

10594 U.S. PTO
09/568783
05/10/00

095 733-051000

05/10/00
10594 U.S. PTO

102

4. Fee calculation:

For	Basic Fee	Dependent Claims	Independent Claims	Multiple Dependent Claims
Basic Fee				\$690.00
Total Claims	23	3	18	54.00
Independent Claims	9	6	78	468.00
Multiple Dependent Claims				0
TOTAL				\$1212.00

5. Authority is hereby granted to charge Deposit Account No. 03-4000 the total fees (\$1,212.00) and any other fees, or to credit any overpayment, for filing the above-captioned application.

6. Address all future communications to:

Michael J. Beck
Patent Department
Bayer Corporation
800 Dwight Way
P.O. Box 1986
Berkeley, CA 94701

Respectfully submitted,

Dated: May 10, 2000

Michael J. Beck
Michael J. Beck
Attorney for Applicants
Reg. No. 40,907
Bayer Corporation
800 Dwight Way
P.O. Box 1986
Berkeley, CA 94701
(510) 705-7916

09568783.051000

14
108

Patent MSB-7266

APPLICATION FOR UNITED STATES PATENT

09568783-051000

Title: Method of Regulating Angiogenesis Using Ryk Protein

Inventor: Steve Roczniak, Nathalie A. Dubois-Stringfellow, Alya Zolotarev

109

BACKGROUND OF THE INVENTION

Field This invention relates to a method of regulating angiogenesis using newly identified polypeptides or polynucleotides encoding such polypeptides. More particularly, the method comprises using the Ryk protein, or fragments derived therefrom, to regulate angiogenesis in human or animal tissue.

Background Ryk is a member of the Receptor Tyrosine Kinase (RTK) family that has impaired catalytic activity and whose ligand(s) have not yet been identified. Ryk has been described by Stacker, et al. in WIPO publication WO 93/23429 (Appl'n No. PCT/AU93/00210). The open reading frame of human Ryk encodes 607 amino acids (aa), has 2 potential transmembrane domains and exhibits closest homology in its catalytic (i.e., activation and nucleotide binding) domain to RTKs such as met (HGF/SF-R) and IGF-1R (Tamagnone et al., Oncogene 1993; 8:2009). The Ryk catalytic region shows closest homology with v-sea (39%) (Wang et al., Mol. Med. 1996; 2:189). Ryk differs from other RTK family members at a number of conserved residues in its catalytic domain (Katso et al., Mol. Cell. Biol. 1999; 19:6427). The amino acid substitutions in this domain account for Ryk's inability to undergo autophosphorylation or to phosphorylate substrates. However, ligand stimulation of a Ryk chimeric receptor results in activation of mitogen-activated protein kinase pathway (Katso et al., Mol. Cell. Biol. 1999; 19:6427). Ryk does not exhibit significant homology in its extracellular domain to other RTK families. Ryk has a relatively small (183 aa) extracellular domain, which contains five potential N-linked glycosylation sites (Stacker et al., PNAS 1992; 89:11818). The human and mouse ryk sequences are 92% identical at the nucleotide level and 97% identical at the amino acid level (Stacker et al., PNAS 1992; 89:11818).

Immunochemical studies of normal tissues have indicated that Ryk is expressed in epithelium, stroma and blood vessels (Katso et al., Cancer Res. 1999; 59:2265). Northern Blot analyses show the presence of the Ryk mRNA in many tissues, including heart, brain, lung,

placenta, liver, muscle, kidney and pancreas (Wang et al., Mol. Med. 1996; 2:189). In situ hybridization analysis have shown that the Ryk gene is expressed almost exclusively in the epithelial and stromal compartments of the brain, lung, colon, kidney and breast (Wang et al., Mol. Med. 1996; 2:189). Ryk RNA is present at greatly increased levels in the basal layer of skin and tongue epithelia and the intervillous layer and some crypt bases of the intestine (Serfas et al., Oncogene 1998; 17:3435). Ryk is induced in epithelial cells seeking a final place in a differentiated tissue or during remodeling of the endometrium, and it has been hypothesized to be involved in cellular recognition (Serfas et al., Oncogene 1998; 17:3435).

Human Ryk is overexpressed in borderline and malignant ovarian tumors (Katso et al., Cancer Res. 1999; 59:2265). In serous and clear cell tumor subtypes, increased expression is observed in epithelium, stroma, and blood vessels. In malignant tumors, the increased expression is predominantly confined to epithelium (Wang et al., Mol. Med. 1996; 2:189). The human Ryk cDNA has been isolated from a complementary DNA library of SKOV-3, an epithelial ovarian cancer cell line, using PCR (Wang et al., Mol. Med. 1996; 2:189). There is minimal to absent expression of human Ryk on the surface epithelium of normal ovaries. Overexpression of human Ryk in the mouse fibroblast cell line NIH3T3 induces anchorage-independent growth and tumorigenicity in nude mice (Katso et al., Cancer Res. 1999; 59:2265). These observations suggest that Ryk may be involved in tumor progression.

RYK is the mammalian homologue of Drosophila Lio protein which has been determined to be involved in learning and memory and axon guidance (pathway selection) in the embryo & adult (Moreau-Fauvarque et al., Mech. Dev. 1998; 78:47). Lionette was identified in screens for embryonic nervous system axonal guidance defects called derailed. Lionette mutants (derailed) are viable but present structural brain defects in the adult central complex where the central brain axons behave as if abnormally attracted by midbrain area. In derailed mutant embryos, a small set of interneurons that expressed the gene failed to make correct pathway choices (Callahan et al. Nature 1995; 376:171).

111

Ryk is expressed in CD3-, CD4-, and CD8- T cells, pre-T cells, thymic epithelial cells, and mature myeloid cells, but not myeloid precursors or B cell precursors (Simoneaux et al., J. Immunol. 1995; 154:1157). Ryk expression is observed in differentiated cells (Lin+) but not in precursor cells (Lin-), and it was hypothesized that Ryk expression may be regulated during hematopoietic development by lineage commitment and stage of maturation.

Ryk is also expressed by a small subset of developing embryonic muscles and neighboring epidermal cells during muscle attachment site selection (Callahan et al., Development 1996; 122:2761). In derailed mutants, muscles often fail to attach at appropriate locations although their epidermal attachment cells appear unaffected.

Angiogenesis, the formation of new capillaries from preexisting blood vessels, is a multistep, highly orchestrated process involving vessel sprouting, endothelial cell migration, proliferation, tube differentiation, and survival. Several lines of direct evidence now suggest that angiogenesis is essential for the growth and persistence of solid tumors and their metastases (Folkman et al. (1989) Nature 339:58-61; Hori et al. (1991) Cancer Research 51:6180-84; Kim et al. (1993) Nature 362:841-844; Millauer et al. (1996) Cancer Research 56:1615-20). To stimulate angiogenesis, tumors upregulate their production of a variety of angiogenic factors, including the fibroblast growth factors (FGF and bFGF) (Kandel et al. (1991) Cell. 66:1095-104) and vascular endothelial cell growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF). However, many malignant tumors also generate inhibitors of angiogenesis, including angiostatin and thrombospondin (Chen et al. (1995) Cancer Research 55:4230-33; Good et al. (1990) Proc Natl Acad Sci U S A. 87:6624-28; O'Reilly et al. (1994) Cell 79:315-28). It is postulated that the angiogenic phenotype is the result of a net balance between these positive and negative regulators of neovascularization (Good et al. (1990), *supra*; O'Reilly et al. (1994), *supra*; Parangi et al. (1996) Proc Natl Acad Sci U S A. 93:2002-07; Rastinejad et al. (1989) Cell 56:345-55).

112

Several other endogenous inhibitors of angiogenesis have been identified, although not all are associated with the presence of a tumor. These include platelet factor 4 (Gupta et al. (2000) Blood 95:147-55), interferon-alpha, interferon-inducible protein 10 (Angiolillo et al. (1996) Ann. N.Y. Acad. Sci. 795:158-67; Strieter et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:27348-57), which is induced by interleukin-12 and/or interferon-gamma, gro-beta (Cao et al. (1995) J. Exp. Med. 182:2069-77), and the 16 kDa N-terminal fragment of prolactin (Clapp et al. (1999) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 40:2498-505). The only known angiogenesis inhibitor which specifically inhibits endothelial cell proliferation is angiostatin (O'Reilly et al. (1994), *supra*). Angiostatin is an approximately 38 kiloDalton (kDa) specific inhibitor of endothelial cell proliferation. Angiostatin is an internal fragment of plasminogen containing at least three of the five kringles of plasminogen. Angiostatin has been shown to reduce tumor weight and to inhibit metastasis in certain tumor models. (O'Reilly et al. (1994), *supra*). Assays used for measuring effect on angiogenesis activity include corneal pocket assay (Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1999, 40: 2498-505), chorioallantoic membrane angiogenesis assay (CAM) (Am. J. Pathol. 1983, 111(3):282-7), and endothelial cell proliferation and migration assays (Biochem. Biophys. Res. Comm. 2000, 271:499-508).

SUMMARY OF THE INVENTION

We have now discovered that the Ryk protein possesses a novel biological activity in regulating angiogenesis. This activity has been demonstrated via *in vitro* and *in vivo* assays for detecting molecules having activity in modulating angiogenesis. The activity was measured using variant Ryk proteins which lacked the transmembrane portion of the protein, thus rendering the variant Ryk proteins soluble. As used herein, a "variant Ryk protein" is intended to include a full length Ryk protein or fragments derived from the full length Ryk protein as described further below, where the variant Ryk protein exhibits activity in regulating angiogenesis.

The instant invention encompasses the use of a variant Ryk protein for regulating or modulating angiogenesis. The current invention further encompasses the use of a variant Ryk protein for the treatment of a disease or clinical condition where angiogenesis is relevant to the causation or treatment of the disease or clinical condition, including but not limited to cancer, wound healing, diabetic retinopathies, macular degeneration, and cardiovascular diseases. Further uses of the protein include treatment of clinical conditions involving angiogenesis in the reproductive system, including regulation of placental vascularization or use as an abortifacient. The instant invention also encompasses pharmaceutical compositions containing a variant Ryk protein and the use of the pharmaceutical compositions for the treatment of the abovementioned diseases or clinical conditions.

In accordance with one aspect of the present invention, there are provided novel mature polypeptides comprising the amino acid sequence given in SEQ ID NO:1 as well as biologically active and diagnostically or therapeutically useful fragments, analogues and derivatives thereof. As an additional aspect of the present invention, there are provided antibodies to the polypeptides of the present invention, especially antibodies which bind specifically to an epitope made up of the sequence described in SEQ ID NO:1 or a sequence which shares at least a 60%, preferably at least a 70%, more preferably at least an 80%, still more preferably a 90%, or most preferably at least a 95% sequence identity over at least 20, preferably at least 30, more preferably at least 40, still more preferably at least 50, or most preferably at least 100 residues to SEQ ID NO:1.

In accordance with another aspect of the present invention, there are provided isolated nucleic acid molecules encoding the polypeptides of the present invention, including mRNAs, DNAs, cDNAs, genomic DNA, as well as antisense analogs thereof and biologically active and diagnostically or therapeutically useful fragments thereof.

In accordance with still another aspect of the present invention, there are provided processes for producing such polypeptides by recombinant techniques through the use of

recombinant vectors. As a further aspect of the present invention, there are provided recombinant prokaryotic and/or eukaryotic host cells comprising a nucleic acid sequence encoding a polypeptide of the present invention.

5 In accordance with a further aspect of the present invention, there is provided a process for utilizing such polypeptides, or polynucleotides encoding such polypeptides, for therapeutic purposes involving the regulation of angiogenesis, for example, the treatment of cancer, wound healing, diabetic retinopathies, macular degeneration, cardiovascular diseases, and clinical conditions involving angiogenesis in the reproductive system, including regulation of placental vascularization or use as an abortifacient.

In accordance with another aspect of the present invention, there are provided nucleic acid probes comprising nucleic acid molecules of sufficient length to specifically hybridize to a polynucleotide encoding a polypeptide of the present invention.

In accordance with yet another aspect of the present invention, there are provided diagnostic assays for detecting diseases or susceptibility to diseases related to mutations in a nucleic acid sequence of the present invention and for detecting over-expression or underexpression of the polypeptides encoded by such sequences.

20 In accordance with another aspect of the present invention, there is provided a process involving expression of such polypeptides, or polynucleotides encoding such polypeptides, for purposes of gene therapy. As used herein, gene therapy is defined as the process of providing for the expression of nucleic acid sequences of exogenous origin in an individual for the
25 treatment of a disease condition within that individual.

05588783-051000

MSB
115

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1 shows the dose dependent inhibitory effect of Ryk-Fc on HUVEC capillary-like organization in MATRIGEL matrix. Results are expressed as percentage of control, which represents the capillary-like organization of untreated HUVEC in MATRIGEL matrix.

Figure 2 shows the dose dependent inhibitory effect of Ryk-myc-His containing supernatant on HUVEC capillary-like organization in MATRIGEL matrix. Results are expressed as percentage of control, which represents the capillary-like organization of untreated HUVEC in MATRIGEL matrix.

Figure 3 shows the dose dependent inhibitory effect of Ryk-Fc on HUVEC capillary-like organization in MATRIGEL matrix in the presence of exogenously added bFGF, VEGF or IL-8. Results are expressed as percentage of control, which represents the capillary-like organization of untreated HUVEC in MATRIGEL matrix.

Figure 4 shows the effect the expression of Ryk-Fc on the growth of B16 melanoma lung metastases *in vivo* in syngeneic mice. B16 cells were infected *ex vivo* with an adenovirus containing the Ryk-Fc gene and implanted in mice by tail vein injection. Results are expressed as number of lung metastases.

09566783-051000

20

SPECIFIC EMBODIMENTS

Materials and Methods

Expression of Ryk-Fc fusion protein: The cDNA corresponding to the extracellular domain of Ryk (SEQ ID NO:1) was fused at its 3' end to the cDNA encoding the Fc tag (SEQ ID NO:2) and at its 5' end to the cDNA encoding the signal peptide sequence (SEQ ID NO:3). The resulting fusion gene (polynucleotide sequence given in SEQ ID NO:10) was cloned into a vector containing an hCMV promoter to drive gene expression and an ampicillin resistance gene for selection, and the protein was expressed in hEK293E cells (Invitrogen, Carlsbad, CA). The Ryk-Fc fusion protein having the sequence given by SEQ ID NO:5 (lacking the signal peptide sequence, which is removed during processing by the cells during secretion) was purified from conditioned medium by a one step purification using a Protein-A-Sepharose affinity resin. Elution of the Ryk-Fc fusion protein from the affinity resin was performed with 0.2 M glycine, pH 2.8. The eluate was immediately neutralized with saturated sodium bicarbonate to pH 7.5-8.0 and dialyzed into phosphate buffered saline with dialysis membrane (6,000 dalton cut-off) overnight at 5°C. Analytical analysis of the purified Ryk-Fc fusion protein by SDS-PAGE and Western blot analysis with anti-Fc antibodies indicated the presence of two components, one at the expected molecular mass of the monomer (~60 kDa) and the other at the mass predicted for the dimer (~120 kDa).

Expression of Ryk-myc-His fusion protein: This variant Ryk protein described by SEQ ID NO:6 was prepared in an adenoviral expression system. A cDNA corresponding to the Ryk extracellular domain with an extra 10 amino acid residues of the wild-type Ryk sequence as compared to the Ryk-Fc fusion protein was fused to cDNAs corresponding to a signal sequence peptide (SEQ ID NO:3) and a myc-(6X)His sequence (SEQ ID NO:12). The resulting cDNA, described by SEQ ID NO:11, was cloned into the BglII-HindIII sites of a CMV shuttle. (He et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA.. 95:2509-14.) This plasmid is known as RYK-myc-his6 pShuttleCMV. 293A cells (Quantum Biotechnologies) were grown

112

on a 6 well plate in DMEM+10%FBS. Once cells had reached confluence, they were rinsed two times with OPTI-MEM 1 reduced serum medium (Life Technologies, Gaithersburg, MD) and incubated with LIPOFECTAMINE transfection solution. The transfection solution was produced according to the supplier's information (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). Briefly, 3 μ g of RYK-myc-his6-pShuttleCMV DNA was diluted in 0.25 ml OPTI-MEM 1 reduced serum medium and mixed with 30 μ l LIPOFECTAMINE transfection solution that was diluted in 0.25 ml OPTI-MEM 1 reduced serum medium. The mixture was added to the cells and incubated for 4.5 hours. DMEM+10%FBS was added and incubated over night. The next day the medium was changed to DMEM 10%FBS. After another 24 hours the medium was changed to OPTI-MEM 1 reduced serum medium. 293A cells which had not been transfected were also incubated in OPTI-MEM 1 reduced serum medium to serve as a control in subsequent assays. The supernatant was collected after 48 hours of incubation.

In vitro MATRIGEL matrix assay: Human umbilical cord endothelial cells (HUVEC, from ATCC, Manassas, VA) were seeded at 3×10^4 cells per well in HUVEC complete medium. The HUVEC complete medium contained F12K medium with 2 mM L-glutamine, 100 ug/ml Heparin, 50 ug/ml endothelial cell growth supplement (ECGS), and 10% fetal bovine serum (FBS). Murine lung endothelial cells (MLuEC) were seeded at 5×10^4 cells per well in a complete medium containing DMEM with 2mM L-glutamine, 1% Pen/Strep, and 10% FBS. MATRIGEL basement membrane matrix (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) was prepared using pre-cooled pipettes, tips, plates and tubes during handling of the matrix. The matrix was thawed at 4°C overnight on ice, used to coat a 24-well plate (Costar, VWR, West Chester, PA) at 0.3 ml/well, and then polymerized at 37°C for 2 hours. Test samples were added in 0.5 ml of complete medium per well, and either HUVEC or MLuEC cells were added in 0.5 ml of medium per well, so the total volume of medium per well was 1.0 ml. Experiments were conducted in triplicate, with varying protein concentration (from 2.5 μ M to 250 nM with log increment, or from 1:4 to 1:4000 dilution of variant Ryk protein-containing supernatant). Cells were incubated overnight at 37°C, 5% CO₂, then fixed and stained using a DIFF-QUIK staining set (VWR, West Chester, PA). Plates were dipped in Fixative Solution for 5 seconds,

09566783.051000

741
118

in Solution 1 for 5 seconds, and in Solution 2 for 5 seconds, then rinsed with deionized water and allowed to dry. Plates were then examined under inverted microscope, and quantitative analysis of the capillary-like structures was performed. As used herein, the term "capillary-like structures" refers to the organizational structures that result from the behavior of endothelial cells *in vitro* on a MATRIGEL Matrix. The term "capillary-like structures" can also include organized cells *in vivo* or *in vitro* leading up to and participating in angiogenesis which results in the cells in association with each other and forming capillaries.

B16 tumor model: Murine B16.F10 melanoma cells (CRL-6475, American Type Culture Collection, Manassas, VA) were infected with non-replicative adenoviral particles containing the gene encoding for RYK-Fc (Ad-RYK-Fc), Interleukin-2 (Ad-IL2) or VEGF (Ad-VEGF). Twenty-four hours after infection, cells were trypsinized, washed and resuspended in PBS. An aliquot of cells (2×10^5 cells in a volume of 200 μ l) was then injected intravenously into the tail vein of C57BL/6 female mice (Charles River Laboratories, Wilmington, Mass.) The animals were sacrificed 14 days post injection, and the lungs were collected, fixed and analyzed for weight and metastases count.

The polypeptides of the present invention include polypeptides having the deduced amino acid sequence given by SEQ ID NO:1. The polypeptides of the present invention may include additional amino acid sequences appended to the N- or C-terminal of the peptides having the deduced amino acid sequence given by SEQ ID NO:1. The polypeptides of the present invention may be recombinant polypeptides, natural polypeptides, or synthetic polypeptides, preferably recombinant polypeptides. As used herein, "protein" is synonymous with "polypeptide."

The present invention further relates to a polypeptide which shares at least a 60%, preferably at least a 70%, more preferably at least an 80%, still more preferably a 90%, yet still more preferably a 95%, or most preferably at least a 98% sequence identity over at least 20,

preferably at least 30, more preferably at least 40, still more preferably at least 50, yet still more preferably at least 100, or most preferably at least 150 residues with SEQ ID NO:1. (Such polypeptides may be herein referred to as "polypeptides of the present invention".) As used herein, a "variant Ryk protein" is intended to include a polypeptide of the present invention as referred to in this paragraph. In a preferred embodiment of the invention, the polypeptide of the present invention is at least 20, preferably at least 30, more preferably at least 40, still more preferably at least 50, or most preferably at least 100 residues long. In one preferred embodiment, the peptide of the present invention is less than 600, preferably less than 550, more preferably less than 500, still more preferably less than 480 residues long. In another preferred embodiment, the peptide of the present invention is less than 250, preferably less than 185, more preferably less than 150, still more preferably less than 100 residues long, or most preferably less than 60 residues long. The invention also contemplates polypeptides which share at least a 60%, preferably at least a 70%, more preferably at least an 80%, still more preferably a 90%, or most preferably at least a 95% sequence identity over at least 20, preferably at least 30, more preferably at least 40, still more preferably at least 50, or most preferably at least 100 residues with SEQ ID NO:4. SEQ ID NO:4 is the full length Ryk protein sequence which includes SEQ ID NO:1 as a lesser included sequence (SEQ ID NO:1 is the same as residues 47 to 227 of SEQ ID NO:4). Polypeptides of the present invention exhibiting such a percent identity to sequences as above-described may be assayed for biological activity as described herein by using the MATRIGEL matrix assay or by using other assays directed to measuring activity in regulating angiogenesis, as are known in the art. The process of measuring for biological activity is within the scope of one skilled in the art given the disclosure herein. Modulating angiogenesis includes processes resulting in either upregulation or downregulation of angiogenic processes.

Such a polypeptide as described above may be (i) one in which one or more of the amino acid residues are substituted (as compared to SEQ ID NO:1) with a conserved or non-conserved amino acid residue (preferably a conserved amino acid residue) and such substituted amino acid residue may or may not be one encoded by the genetic code, or (ii) one in which

123
120

one or more of the amino acid residues includes a substituent group, or (iii) one in which the mature polypeptide is fused with another compound, such as a compound to increase the half-life of the polypeptide (for example, polyethyleneglycol), or (iv) one in which additional amino acids are fused to the mature polypeptide, such as a leader or secretory sequence or a sequence which is employed for purification of the mature polypeptide or a proprotein sequence or mature protein sequence beyond the Ryk extracellular domain, or (v) one in which one or more amino acids are deleted from or inserted into the sequence of the polypeptide. Combinations of the above-described types of variations in the peptide sequence are within the scope of the invention. Such polypeptides are deemed to be within the scope of those skilled in the art from the teachings herein.

A polypeptide of the present invention may contain amino acids other than the 20 gene-encoded amino acids. The polypeptides may be modified by either natural processes, such as posttranslational processing, or by chemical modification techniques which are well known in the art. Such modifications are well described in basic texts and in more detailed monographs, as well as in a voluminous research literature. Modifications can occur anywhere in a polypeptide, including the peptide backbone, the amino acid side-chains, and the amino or carboxyl termini. It will be appreciated that the same type of modification may be present in the same or varying degrees at several sites in a given polypeptide. Also, a given polypeptide may contain many types of modifications. Polypeptides may be branched, for example, as a result of ubiquitination, and they may be cyclic, with or without branching. Cyclic, branched, and branched cyclic polypeptides may result from posttranslational natural processes or may be made by synthetic methods. Modifications include acetylation, acylation, ADP-ribosylation, amidation, covalent attachment of flavin, covalent attachment of a heme moiety, covalent attachment of a nucleotide or nucleotide derivative, covalent attachment of a lipid or lipid derivative, covalent attachment of phosphatidylinositol, cross-linking, cyclization, disulfide bond formation, demethylation, formation of covalent cross-links, formation of cysteine, formation of pyroglutamate, formylation, gamma-carboxylation, glycosylation, GPI anchor formation, hydroxylation, iodination, methylation, myristoylation, oxidation, pegylation,

274
121

proteolytic processing, phosphorylation, prenylation, racemization, selenoylation, sulfation, transfer-RNA mediated addition of amino acids to proteins such as arginylation, and ubiquitination.

5 The polypeptides and polynucleotides of the present invention are preferably provided in an isolated form, and preferably are purified to homogeneity. The term "isolated" means that the material is removed from its original environment (e.g., the natural environment if it is naturally occurring). For example, a naturally occurring polynucleotide or polypeptide present in a living animal is not isolated, but the same polynucleotide or polypeptide, separated from some or all of the coexisting materials in the natural system, is isolated. Such polynucleotide could be part of a vector and/or such polynucleotide or polypeptide could be part of a composition, and still be isolated in that such vector or composition is not part of its natural environment.

As known in the art "similarity" between two polypeptides is determined by comparing the amino acid sequence and its conserved amino acid substitutes of one polypeptide to the sequence of a second polypeptide. Such conservative substitutions include those described by Dayhoff, The Atlas of Protein Sequence and Structure 5 (1978) and by Argos, EMBO J. 8: 779-785 (1989). For example, amino acids belonging to one of the following groups represent conservative changes:

- ala, pro, gly, gln, asn, ser, thr;
- cys, ser, tyr, thr;
- val, ile, leu, met, ala, phe;
- lys, arg, his;
- phe, tyr, trp, his; and
- asp, glu.

(Note that these grouping are examples; other groupings may represent more relevant choices.)

09568783-051000

693807-03

20

25

30

476
123

RTFSDKPVAH--VANPQLQWLNRRANALLANGVE-RDMLVVE--GLYLIYSQVLF 56 resid.
R P K A+ VA +L W N+ + +L +GV +D LV++ GLY I Q+ F 31 simil.
RAPEFKSWAYLQVAKHLSW-NK--DGIL-HGVRYQDGNLVIQFPGLYFIICQLQF 56 resid.
First sequence is SEQ ID NO:7; second sequence is SEQ ID NO:8

5

Both of the sequences in the aligned region may be contained within longer, possibly less homologous sequences. "Unrelated" or "non-homologous" sequences typically share less than 40% identity at the peptide level, preferably less than 25% identity.

10

0 568783 .051000g

The invention further encompasses polynucleotides which code for the above-described polypeptides of the present invention. These polynucleotides may be in the form of RNA or in the form of DNA, which DNA includes cDNA, genomic DNA, and synthetic DNA. The DNA may be double-stranded or single-stranded. The polynucleotides may include: only the coding sequence for the mature polypeptide; the coding sequence for the mature polypeptide and additional coding sequence such as a leader or secretory sequence or a proprotein sequence; the coding sequence for the mature polypeptide (and, optionally, additional coding sequence) and non-coding sequence, such as introns or non-coding sequence 5' and/or 3' of the coding sequence for the mature polypeptide. Thus, the term "polynucleotide encoding a polypeptide" encompasses a polynucleotide which includes only coding sequence for the polypeptide as well as a polynucleotide which includes additional coding and/or non-coding sequence.

25

The present invention further relates to variants of the herein above-described polynucleotides. The variants of the polynucleotides may be naturally occurring allelic variants of the polynucleotides or non-naturally occurring variants of the polynucleotides. As known in the art, an allelic variant is an alternate form of a polynucleotide sequence which may have a substitution, deletion, or addition of one or more nucleotides which does not substantially alter the function of the encoded polypeptides. Thus, the present invention includes polynucleotides encoding the same mature polypeptide as described in Example 1, below, as well as variants of such polynucleotides which variants include deletion variants, substitution variants, and addition or insertion-variants.

30

The present invention also includes polynucleotides wherein the coding sequence for the mature polypeptides may be fused to a polynucleotide sequence which aids in expression and secretion of a polypeptide from a host cell, for example, a leader sequence which functions as a secretory sequence for controlling transport of a polypeptide from the cell. The polypeptide having a leader sequence is a preprotein and may have the leader sequence cleaved by the host cell to form the mature form of the polypeptide. The polynucleotides may also encode for a proprotein which is the mature protein plus additional amino acid residues. A mature protein having a prosequence is a proprotein and is an inactive form of the protein. Once the prosequence is cleaved an active mature protein remains. For example, the polynucleotides of the present invention may code for a mature protein or for a protein having a prosequence or for a protein having both a prosequence and a presequence (leader sequence).

The polynucleotides of the present invention may also have the coding sequence fused in frame to a marker sequence which allows for purification of the polypeptide of the present invention. The marker sequence may be, for example, a hexa-histidine tag supplied by a pQE-9 vector to provide for purification of the mature polypeptide fused to the marker in the case of a bacterial host, or, for example, the marker sequence may be a hemagglutinin (HA) tag when a mammalian host, e.g. COS-7 cells, is used. The HA tag corresponds to an epitope derived from the influenza hemagglutinin protein. Wilson et al., 1984, Cell 37: 767. Other tag systems are well-known in the art, including the FLAG tag. The FLAG tag is based on the FLAG marker octapeptide (N-AspTyrLysAspAspAspLys-C) (SEQ ID NO:9). The FLAG sequence is hydrophilic and the last 5 amino acids (AspAspAspAspLys) (subsequence of SEQ ID NO:9) represent the target sequence of the protease enterokinase.

The term "gene" means the segment of DNA involved in producing a polypeptide chain; it includes regions preceding and following the coding region (leader and trailer) as well as intervening sequences (introns) between individual coding segments (exons). Fragments of a gene may be used as a hybridization probe for a cDNA library to isolate the full length gene

178
125

and to isolate other genes which have a high sequence similarity to the gene or similar biological activity. Probes of this type typically have at least 20 bases and preferably have at least 30 bases and may contain, for example, 50 or more bases. The probe may also be used to identify a cDNA clone corresponding to a full length transcript and a genomic clone or clones that contain the complete gene including regulatory and promotor regions, exons, and introns. An example of a screen comprises isolating the coding region of a gene by using the known DNA sequence to synthesize an oligonucleotide probe. Labeled oligonucleotides having a sequence complementary to that of the gene are used to screen a library of human cDNA, genomic DNA or mRNA to determine which members of the library the probe hybridizes to.

The present invention is directed to polynucleotides having at least a 70% identity, preferably at least 80% identity, more preferably at least a 90% identity, still more preferably at least a 95% identity, and most preferably at least 98% identity to a polynucleotide which encodes a polypeptide of the present invention, as well as fragments thereof, which fragments have at least 20 bases and preferably have at least 30 bases and more preferably have at least 50 bases, and to polypeptides encoded by such polynucleotides. A preferred embodiment is given by polynucleotides that have at least a 70% identity, preferably at least 80% identity, more preferably at least a 90% identity, still more preferably at least a 95% identity, and most preferably at least 98% identity to a polynucleotide which encodes the polypeptide having the sequence given by SEQ ID NO:1. Such polynucleotides may be contained within larger nucleotide sequences, as in one embodiment of the present invention given by SEQ ID NO:10. In preferred embodiments the invention is directed to polynucleotides which are less than 1500, preferably less than 1000, more preferably less than 600, still more preferably less than 200, yet still more preferably less than 100, most preferably less than 35 bases long.

The present invention also relates to vectors that include polynucleotides of the present invention as above described, host cells that are genetically engineered with vectors of the invention, and the production of polypeptides of the invention by recombinant techniques. Host cells may be genetically engineered (transduced or transformed or transfected) with the

178
126

vectors of this invention which may be, for example, a cloning vector or an expression vector. The vector may be, for example, in the form of a plasmid, a viral particle, a phage, etc. The engineered host cells can be cultured in conventional nutrient media modified as appropriate for activating promoters, selecting transformants, or amplifying the gene for the polypeptide of the present invention. The culture conditions, such as temperature, pH and the like, are those previously used with the host cell selected for expression, and will be apparent to the ordinarily skilled artisan. The polynucleotide of the present invention may be employed for producing a polypeptide by recombinant techniques.

Thus, for example, the polynucleotide sequence may be included in any one of a variety of expression vehicles, in particular vectors or plasmids for expressing a polypeptide. Such vectors include chromosomal, non-chromosomal and synthetic DNA sequences, e.g., derivatives of SV40; bacterial plasmids; phage DNA; yeast plasmids; vectors derived from combinations of plasmids and phage DNA, viral DNA such as vaccinia, adenovirus, fowl pox virus, and pseudorabies. However, any other vector or plasmid may be used as long as they are replicable and viable in the host.

The appropriate DNA sequence may be inserted into the vector by a variety of procedures. Such procedures and others are deemed to be within the scope of those skilled in the art. The DNA sequence in the expression vector is operatively linked to an appropriate expression control sequence(s) (promoter) to direct mRNA synthesis. As representative examples of such promoters, there may be mentioned: LTR or SV40 promoter, the E. coli. lac or trp, the phage lambda PL promoter and other promoters known to control expression of genes in prokaryotic or eukaryotic cells or their viruses. The expression vector may also contain a ribosome binding site for translation initiation and a transcription terminator. The vector may also include appropriate sequences for amplifying expression. In addition, the expression vectors preferably contain a gene to provide a phenotypic trait for selection of transformed host cells such as dihydrofolate reductase or neomycin resistance for eukaryotic cell culture, or such as tetracycline or ampicillin resistance in E. coli. The vector containing

09568783 0051000

137
127

the appropriate DNA sequence as herein above described, as well as an appropriate promoter or control sequence, may be employed to transform an appropriate host to permit the host to express the protein. As representative examples of appropriate hosts, there may be mentioned: bacterial cells, such as *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Streptomyces*; fungal cells, such as yeast; insect cells, such as *Drosophila* S2 and *Spodoptera* Sf9; animal cells such as CHO, COS or Bowes melanoma; plant cells, etc. The selection of an appropriate host is deemed to be within the scope of those skilled in the art from the teachings herein.

The present invention also includes recombinant constructs comprising one or more of the sequences as broadly described above. The constructs comprise a vector, such as a plasmid or viral vector, into which a sequence of the invention has been inserted, in a forward or reverse orientation. In a preferred aspect of this embodiment, the construct further comprises regulatory sequences, including, for example, a promoter, operably linked to the sequence. Large numbers of suitable vectors and promoters are known to those of skill in the art and are commercially available. The following vectors are provided by way of example. Bacterial: pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen), pBS, phagescript, psiX174, pBluescript SK, pBaKS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene), pTRC99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, PRIT5 (Pharmacia). Eukaryotic: pWLneo, pSV2cat, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG, PSVL (Pharmacia). However, any other plasmid or vector may be used as long as they are viable or can be made viable in the host. Promoter regions can be selected from any desired gene using CAT (chloramphenicol acetyl transferase) vectors or other vectors with selectable markers. Two appropriate vectors are pKK232-8 and pCM7. Particular named bacterial promoters include *lacI*, *lacZ*, T3, T7, *gpt*, *lambda* PR, PL and *trp*. Eukaryotic promoters include CMV immediate early, HSV thymidine kinase, early and late SV40, LTRs from retrovirus, and mouse metallothionein-I. Selection of the appropriate vector and promoter is well within the level of ordinary skill in the art.

The present invention also relates to host cells containing the above-described construct. The host cell can be a higher eukaryotic cell, such as a mammalian cell, or a lower

09568783-051000

13
128

eukaryotic cell, such as a yeast cell, or the host cell can be a prokaryotic cell, such as a bacterial cell. Introduction of the construct into the host cell can be effected by calcium phosphate transfection, DEAE-Dextran mediated transfection, or electroporation. The constructs in host cells can be used in a conventional manner to produce the gene product encoded by the recombinant sequence. Alternatively, the polypeptides of the invention can be synthetically produced by conventional peptide synthesizers.

Mature proteins can be expressed in mammalian cells, yeast, bacteria, or other cells under the control of appropriate promoters. Cell-free translation systems can also be employed to produce such proteins using RNAs derived from the DNA constructs of the present invention. Appropriate cloning and expression vectors for use with prokaryotic and eukaryotic hosts are described by Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; the disclosure of which is hereby incorporated by reference).

Transcription of a DNA encoding the polypeptides of the present invention by higher eukaryotes is increased by inserting an enhancer sequence into the vector. Enhancers are cis-acting elements of DNA, usually from about 10 to 300 bp, that act on a promoter to increase its transcription. Examples include the SV40 enhancer on the late side of the replication origin (bp 100 to 270), a cytomegalovirus early promoter enhancer, a polyoma enhancer on the late side of the replication origin, and adenovirus enhancers. Generally, recombinant expression vectors will include origins of replication and selectable markers permitting transformation of the host cell, e.g., the ampicillin resistance gene of *E. coli* and *S. cerevisiae* TRP1 gene, and a promoter derived from a highly-expressed gene to direct transcription of a downstream structural sequence. Such promoters can be derived from operons encoding glycolytic enzymes such as 3-phosphoglycerate kinase (PGK), alpha factor, acid phosphatase, or heat shock proteins, among others. The heterologous structural sequence is assembled in appropriate phase with translation, initiation and termination sequences, and preferably, a leader sequence capable of directing secretion of translated protein into the periplasmic space

0895 8783-051000

132
129

or extracellular medium. Optionally, the heterologous sequence can encode a fusion protein including an N-terminal identification peptide imparting desired characteristics, e.g., stabilization or simplified purification of expressed recombinant product.

5 Useful expression vectors for bacterial use are constructed by inserting a structural DNA sequence encoding a desired protein together with suitable translation, initiation, and termination signals in operable reading phase with a functional promoter. The vector will comprise one or more phenotypic selectable markers and an origin of replication to ensure maintenance of the vector and, if desirable, to provide amplification within the host. Suitable prokaryotic hosts for transformation include *E.coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* and various species within the genera *Pseudomonas*, *Streptomyces*, and *Staphylococcus*, although others may also be employed as a matter of choice. Useful expression vectors for bacterial use can comprise a selectable marker and bacterial origin of replication derived from commercially available plasmids comprising genetic elements of the well known cloning vector pBR322 (ATCC 37017). Such commercial vectors include, for example, pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) and GEM1 (Promega Biotec, Madison, WI.) These pBR322 "backbone" sections are combined with an appropriate promoter and the structural sequence to be expressed.

20 After transformation of a suitable host strain and growth of the host strain to an appropriate cell density, the selected promoter may be de-repressed, if necessary, by appropriate means (e.g., temperature shift or chemical induction) and the cells may be cultured for an additional period. Cells are typically harvested by centrifugation, disrupted by physical or chemical means, and the resulting crude extract retained for further purification. Microbial
25 cells employed in expression of proteins can be disrupted by any convenient method, including freeze-thaw cycling, sonication, mechanical disruption, or use of cell lysing agents.

 Various mammalian cell culture systems can also be employed to express recombinant protein. Examples of mammalian expression systems include the COS-7 lines of monkey

0856 763-051000

X#3
130

kidney fibroblasts (82) and other cell lines capable of expressing protein from a compatible vector, for example, the C127, 3T3, CHO, HeLa and BHK cell lines. Mammalian expression vectors will generally comprise an origin of replication, a suitable promoter and enhancer, and also any necessary ribosome binding sites, polyadenylation site, splice donor and acceptor sites, transcription termination sequences, and 5' flanking nontranscribed sequences. DNA sequences derived from the SV40 viral genome, for example, SV40 origin, early promoter, enhancer, splice, and polyadenylation sites may be used to provide the required non-transcribed genetic elements.

The polypeptide of the present invention may be recovered and purified from recombinant cell cultures by methods used heretofore, including ammonium sulfate or ethanol precipitation, acid extraction, anion or cation exchange chromatography, phosphocellulose chromatography, hydrophobic interaction chromatography, affinity chromatography, hydroxyapatite chromatography and lectin chromatography. Protein refolding steps can be used, as necessary, in completing configuration of the mature protein. Finally, high performance liquid chromatography (HPLC) can be employed for final purification steps.

The polypeptide of the present invention may be a naturally purified product, or a product of chemical synthetic-procedures, or produced by recombinant techniques from a prokaryotic or eukaryotic host (for example, by bacterial, yeast, higher plant, insect and mammalian cells in culture). Depending upon the host employed in a recombinant production procedure, the polypeptides of the present invention may be glycosylated with mammalian or other eukaryotic carbohydrates or may be non-glycosylated. Polypeptides of the present invention may also include an initial methionine amino acid residue.

Polypeptides of the present invention, or polynucleotides coding for polypeptides of the present invention, may be used in a process of gene therapy. Such gene therapy may be involved in the treatment of a disease or clinical condition which may include but is not limited to cancer, wound healing, diabetic retinopathies, macular degeneration, cardiovascular

131

diseases, and clinical conditions involving angiogenesis in the reproductive system, including regulation of placental vascularization or use as an abortifacient. For example, cells may be engineered with a polynucleotide (DNA or RNA) encoding for the polypeptide *ex vivo*, the engineered cells are then provided to a patient to be treated with the polypeptide. Such methods are well-known in the art. For example, cells may be engineered by procedures known in the art by use of a retroviral particle containing RNA encoding for the polypeptide of the present invention.

Both *in vitro* and *in vivo* gene therapy methodologies are contemplated. Several methods for transferring potentially therapeutic genes to defined cell populations are known. See, e.g., Mulligan (1993) Science 260: 926-31. These methods include:

1) Direct gene transfer. See, e.g., Wolff et al (1990) Science 247:1465-68.

2) Liposome-mediated DNA transfer. See, e.g., Caplan et al. (1995) Nature Med. 3: 39-46; Crystal (1995) Nature Med. 1:15-17; Gao and Huang (1991) Biochem. Biophys. Res. Comm. 179:280-85.

3) Retrovirus-mediated DNA transfer. See, e.g., Kay et al. (1993) Science, 262:117-19; Anderson (1992) Science 256:808-13. Retroviruses from which the retroviral plasmid vectors hereinabove mentioned may be derived include, but are not limited to, Moloney Murine Leukemia Virus, spleen necrosis virus, retroviruses such as Rous Sarcoma Virus, Harvey Sarcoma Virus, avian leukosis virus, gibbon ape leukemia virus, human immunodeficiency virus, adenovirus, Myeloproliferative Sarcoma Virus, and mammary tumor virus. In one embodiment, the retroviral plasmid vector is derived from Moloney Murine Leukemia Virus.

4) DNA Virus-mediated DNA transfer. Such DNA viruses include adenoviruses (preferably Ad-2 or Ad-5 based vectors), herpes viruses (preferably herpes simplex virus based vectors), and parvoviruses (preferably "defective" or non-autonomous parvovirus based

132

vectors, more preferably adeno-associated virus based vectors, most preferably AAV-2 based vectors). See, e.g., Ali et al. (1994) Gene Therapy, 1:367-84; United States Patent 4,797,368, incorporated herein by reference, and United States Patent 5,139,941, incorporated herein by reference. Adenoviruses have the advantage that they have a broad host range, can infect quiescent or terminally differentiated cells, such as neurons or hepatocytes, and appear essentially non-oncogenic. Adenoviruses do not appear to integrate into the host genome. Because they exist extrachromosomally, the risk of insertional mutagenesis is greatly reduced. Adeno-associated viruses exhibit similar advantages as adenoviral-based vectors. However, AAVs exhibit site-specific integration on human chromosome 19.

The choice of a particular vector system for transferring the gene of interest will depend on a variety of factors. One important factor is the nature of the target cell population. Although retroviral vectors have been extensively studied and used in a number of gene therapy applications, these vectors are generally unsuited for infecting non-dividing cells. In addition, retroviruses have the potential for oncogenicity. However, recent developments in the field of lentiviral vectors may circumvent some of these limitations. See Naldini et al. (1996) Science 272:263-7.

According to this embodiment, gene therapy with DNA encoding a polypeptide of the present invention is provided to a patient in need thereof, concurrent with, or immediately after diagnosis. The skilled artisan will appreciate that any suitable gene therapy vector containing DNA encoding a polypeptide of the present invention may be used in accordance with this embodiment. The techniques for constructing such a vector are known. See, e.g., Anderson (1998) Nature, 392 25-30; Verma (1998) Nature, 389 239-42. Introduction of the vector to the target site may be accomplished using known techniques.

The present invention also relates to a diagnostic assay for detecting levels of polypeptides of the present invention, e.g. in various tissues, since an over-expression of the proteins compared to normal control tissue samples may detect the presence of abnormal

cellular proliferation, for example, a tumor. Assays used to detect levels of protein in a sample derived from a host are well-known to those of skill in the art and include radioimmunoassays, competitive-binding assays, Western Blot analysis, ELISA assays and "sandwich" type assays. Diagnostic assays may also include the detection of polynucleotides which code for the polypeptides of the present invention.

The polypeptides of the present invention can be used as an immunogen to produce antibodies thereto. These antibodies can be, for example, polyclonal or monoclonal antibodies. The present invention also includes chimeric, single chain, and humanized antibodies, as well as Fab fragments, or the product of an Fab expression library. Various procedures known in the art may be used for the production of such antibodies and fragments.

Antibodies generated against the polypeptides of the present invention can be obtained by direct injection of the polypeptides into an animal or by administering the polypeptides to an animal, preferably a nonhuman. The antibody so obtained will then bind the polypeptides itself. In this manner, even a sequence encoding only a fragment of the polypeptides can be used to generate antibodies binding the whole native polypeptides. Such antibodies can then be used to isolate the polypeptide from tissue expressing that polypeptide or as a diagnostic reagent.

For preparation of monoclonal antibodies, any technique which provides antibodies produced by continuous cell line cultures can be used. See generally Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane, eds. (1988) Cold Spring Harbor Laboratory. Examples include the hybridoma technique (Kohler and Milstein (1975) Nature 256:495-97), the trioma technique, the human B-cell hybridoma technique (Kozbor et al. (1983) Immunology Today, 4:72), and the EBV-hybridoma technique to produce human monoclonal antibodies (Cole et al. (1985) in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96).

Techniques described for the production of single chain antibodies (U.S. Pat. No. 4,946,778) can be adapted to produce single chain antibodies to immunogenic polypeptide

09568783-051000

products of this invention. Also, transgenic mice may be used to express humanized antibodies to immunogenic polypeptide products of this invention. Humanized antibodies may also be produced by methods described in U.S. Pat. Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,761; and 5,693,762, incorporated herein by reference.

EXAMPLE 1

The effect of a variant Ryk protein was evaluated *in vitro* using the HUVEC MATRIGEL matrix assay. This assay mimics endothelial cell capillary organization and is a standard *in vitro* assay used to evaluate angiogenic mechanisms. Ryk-Fc was added at different concentrations to HUVEC grown in culture on MATRIGEL matrix. Twenty-four hours later cells were fixed and evaluated for capillary-like organization. Measurement of the capillary-like organization in each well allows a quantitative analysis of the biological effect of tested compounds.

In four separate experiments, Ryk-Fc has been shown to significantly inhibit capillary-like organization in either HUVEC (Figure 1A) or MLEC (Figure 1B). Results from representative experiments are presented in Figure 1. In these experiments Ryk-Fc was added to the cells at various concentrations from 2.5 fM to 250 nM with log increment. The results displayed in Figures 1A and 1B show that Ryk-Fc inhibited capillary-like organization in a dose dependent manner. In these experiments, IL-8-TVR, an IL-8 mutein that has been shown to have an inhibitory effect in this assay, was added at a concentration of 250 nM. IL-8-TVR has the two amino acids Thr-Val substituted for the two amino acids Glu-Leu, respectively, found at positions 3 and 4 of the wild-type IL-8 protein amino acid sequence. As a negative control, buffer (alone) was added to the cells at a volume equivalent to the highest volume added with Ryk-Fc, with no significant effect. In addition, endotoxin at concentrations of 0.1 Eu/mL and 1 Eu/ml was tested to determine if endotoxin could be responsible for the inhibitory effect. The concentration of endotoxin in the Ryk-Fc treated wells varied from 0.7×10^{-8} Eu/ml to 0.7

135

Eu/ml for the 2.5 fM and 250 nM Ryk-Fc concentration, respectively. The results show that endotoxin alone cannot be responsible for the inhibitory effect (data not shown).

EXAMPLE 2

The effect of another variant Ryk protein was evaluated *in vitro* using the HUVEC MATRIGEL matrix assay. Ryk-myc-His was made in 293 cells transfected with a plasmid construct containing the Ryk-myc-His gene as described above under Materials and Methods. The amino acid sequence is identical to that of Ryk-Fc except that an extra ten residues of the wild-type Ryk sequence is included at the C-terminal end of the Ryk portion of the construct and the myc-(6X)His tag sequence has replaced the Fc tag sequence. In an experimental setup similar to that of Example 1, the Ryk-myc-His fusion protein-containing supernatant was added at various dilutions to HUVEC grown in culture on MATRIGEL matrix. Twenty-four hours later cells were fixed and evaluated for capillary-like organization.

Ryk-myc-His has been shown to significantly inhibit HUVEC capillary-like organization. Results from a representative experiment are presented in Figure 2. In this experiment, supernatants obtained from cell cultures expressing the Ryk-myc-His fusion were added to the cells at various dilution factors from 1:4000 to 1:4 with log increment. The results displayed in Figure 2 show that Ryk-myc-His containing supernatant inhibited capillary-like organization in a dose dependent manner. In this experiment, supernatant obtained from cells which did not express any variant Ryk protein (293 cell medium) was added at a dilution factor of 1:4 as a negative control and was shown to have no effect on HUVEC capillary-like organization.

136

EXAMPLE 3

The effect of Ryk-Fc fusion protein in combination with known angiogenic factors including bFGF, VEGF and IL-8 was tested at different concentrations in HUVEC grown in culture on MATRIGEL matrix. Twenty-four hours later cells were fixed and evaluated for capillary-like organization.

In three separate experiments, Ryk-Fc has been shown to significantly inhibit capillary-like organization regardless of the presence of bFGF, VEGF or IL-8. Results from a representative experiment are presented in Figure 3. In this experiment Ryk-Fc was added to the cells at 2.5 pM, 2.5 nM and 25 nM in combination with either bFGF (at 5 nM), VEGF (10 nM), or IL-8 (10 nM). The results displayed in Figure 3 show that Ryk-Fc inhibited capillary-like organization in a dose dependent manner alone or in combination with bFGF, VEGF or IL-8. In this experiment IL-8-TVR was added at a concentration of 250 nM as a positive control. In addition, bFGF, VEGF and IL-8 were tested alone and shown to have no effect on HUVEC capillary-like organization. This result suggests that angiogenic stimuli necessary for HUVEC capillary-like organization are already present either in the MATRIGEL Matrix or in the medium.

EXAMPLE 4

The effect of Ryk-Fc expression was evaluated *in vivo* in the B16 melanoma tumor model. In this model, B16-F10 cells were infected *ex vivo* with non-replicative adenoviral particles containing the Ryk-Fc gene (ad-Ryk-Fc) for 24 hours and then implanted in C57BL/6 mice (Charles River Laboratories, Wilmington, Mass.) intravenously through the tail vein. We have previously shown with various adenoviral constructs that *ex vivo* infection of B16 cells led to *in vivo* expression of the protein of interest for at least 6 days. The B16-F10 cells have

240
137

also previously been shown to colonize the lungs and form metastases when injected intravenously. At 14 days post cell implantation, mice were sacrificed and the lungs were collected. In this model tumor burden is evaluated by counting lung metastases. In this experiment, the controls included mice receiving untreated B16-F10 cells or B16-F10 cells that had been infected *ex vivo* with non-replicative adenoviral particles containing the IL-2 gene (ad-IL-2) or the VEGF gene (ad-VEGF). In previous experiments the expression of IL-2 was shown to have an inhibitory effect on lung metastases whereas the expression of VEGF was shown to have a stimulatory effect. The results presented in Figure 4 show that B16-F10 cells infected with ad-Ryk-Fc gave rise to lower metastasis number than non-infected B16-F10 cells. In this experiment, the expression of IL-2 also inhibited tumor growth whereas the expression of VEGF stimulated tumor growth.

CONCLUSION

There have been no reports of Ryk involvement in angiogenesis. Though Ryk overexpression has been demonstrated in ovarian cancer its role in cancer has not been determined. We have now found that novel variant Ryk proteins quite surprisingly exhibit activity in modulating angiogenesis. To our knowledge, Ryk-Fc and Ryk-myc-His are also the most potent antiangiogenic factors evaluated to date as assayed in the MATRIGEL matrix assay.

We have now discovered that the wild type Ryk protein or other variant Ryk proteins as described herein may be relevant as therapeutic agents to any disease where angiogenesis is involved, including but not limited to cancer, wound healing, diabetic retinopathies, macular degeneration, and cardiovascular diseases. The variant Ryk proteins described herein may further be used in the treatment of clinical conditions involving angiogenesis in the reproductive system, including regulation of placental vascularization, regulation of pregnancy, or use as an abortifacient. In addition to their potential therapeutic use, the polypeptides of the

AK
138

Patent MSB-7266

present invention may find use in diagnostic applications, as may the polynucleotides which code for the polypeptides of the present invention, and as may antibodies to the polypeptides of the present invention.

5 The above examples are intended to illustrate the invention and it is thought variations will occur to those skilled in the art. Accordingly, it is intended that the scope of the invention should be limited only by the claims below.

09568783-051000

142
139

CLAIMS

What is claimed is:

1. A method of modulating angiogenesis at a site, the method comprising causing an effective amount of a composition comprising a variant Ryk protein to be supplied to the site.
2. The method of claim 1 wherein the variant Ryk protein has an amino acid sequence identical to SEQ ID NO:1.
3. The method of claim 1 wherein the variant Ryk protein has an amino acid sequence which is at least 60% identical over at least 40 residues to SEQ ID NO:1.
4. The method of claim 1 wherein the variant Ryk protein has an amino acid sequence which is at least 70% identical over at least 30 residues to SEQ ID NO:1.
5. The method of claim 1 wherein the variant Ryk protein is less than 480 residues long.
6. A method of modulating the formation of cells into capillary-like structures comprising contacting the cells with a biologically effective amount of a composition comprising a variant Ryk protein.
7. The method of claim 6 wherein the cells are endothelial cells of human origin.
8. A protein characterized by having a deduced amino acid sequence which is at least 60% identical over 40 residues to SEQ ID NO:1.
9. The protein according to claim 8, wherein the deduced amino acid sequence is at least 80% identical over 50 residues to SEQ ID NO:1.

7/3
140

10. The protein according to claim 6, wherein the protein is less than 480 residues long.
11. A pharmaceutical composition for modulating angiogenesis comprising a protein characterized by having a deduced amino acid sequence which is at least 60% identical over 40 residues to SEQ ID NO:1 and a pharmaceutically acceptable carrier.
12. The method of claim 1, wherein the site is within a human patient and the protein is supplied to the site via a pharmaceutical composition according to claim 11.
13. The method of claim 12, wherein the site is within a human patient and the protein is supplied to the site via a process of gene therapy.
14. A method for preventing, treating, or ameliorating a medical condition in an individual, the method comprising providing a source of an effective amount of at least one protein according to claim 8 to the individual.
15. The method of claim 14, wherein the protein is supplied to the individual by providing to the individual a source of a polynucleotide encoding the protein and expressing the protein *in vivo*.
16. The method of claim 14, wherein the medical condition is selected from the group consisting of cancer, metastasis, diabetic retinopathy, macular degeneration, cardiovascular disease, a wound, pregnancy, and a clinical condition involving angiogenesis in the reproductive system, including regulation of placental vascularization.
17. A polynucleotide selected from the group consisting of (a) a polynucleotide coding for a protein according to claim 8; and (b) a polynucleotide complementary to (a).

141

18. The polynucleotide according to claim 17, wherein the polynucleotide is operably linked within an expression vector to a promoter.

19. The polynucleotide according to claim 17, wherein the polynucleotide is between 35 and 1500 bases long.

20. A method for producing a protein according to claim 8 comprising the steps of
(a) introducing an expression vector capable of expressing the protein according to claim 8 into a cell capable of expressing the protein according to claim 8,
(b) growing cells resulting from step (a) under conditions sufficient to allow the cells to express the protein according to claim 8, and
(c) recovering the protein according to claim 8 from the result of step (b).

21. An antibody against a protein according to claim 8.

22. A method for diagnosing a disease or medical condition or susceptibility to a disease or medical condition in a mammal, the disease or medical condition related to inadequate or excess expression of a protein according to claim 8, the method comprising the steps

(a) determining the level of expression of said protein in a sample obtained from the mammal; and

(b) comparing the level of expression of said protein against a standard to make a diagnosis.

23. The method of claim 22, wherein the medical condition is selected from the group consisting of cancer, metastasis, diabetic retinopathy, macular degeneration, cardiovascular disease, a wound, pregnancy, and a clinical condition involving angiogenesis in the reproductive system.

147
142

Patent MSB-7266

5

ABSTRACT

Ryk protein was found to have a novel activity in regulating angiogenesis. New variant Ryk proteins were constructed that were useful in modulating the capillary forming activity of endothelial cells. Wild type Ryk protein, or the new variant Ryk proteins, may be employed as therapeutics in diseases such as cancer, wound healing, diabetic retinopathies, macular degeneration, and cardiovascular diseases, and other diseases or clinical conditions where angiogenesis is relevant to the causation or treatment of the disease.

10

0 568785 . 51000

DECLARATION FOR PATENT APPLICATION

Docket Number (Optional)
MSB-7286

As a below named inventor, I hereby declare that:

My residence, post office address and citizenship are as stated below next to my name.

I believe I am the original, first and sole inventor (if only one name is listed below) or an original, first and joint inventor (if plural names are listed below) of the subject matter which is claimed and for which a patent is sought on the invention entitled
METHOD OF REGULATING ANGIOGENESIS USING RYK PROTEIN the specification of which

is attached hereto unless the following box is checked:

☐ was filed on _____ as United States Application Number or PCT International Application Number _____ and was amended on _____ (if applicable).

I hereby state that I have reviewed and understand the contents of the above identified specification, including the claims, as amended by any amendment referred to above.

I acknowledge the duty to disclose information which is material to patentability as defined in Title 37, Code of Federal Regulations, § 1.56.

I hereby claim foreign priority benefits under Title 35, United States Code, § 119 of any foreign application(s) for patent or inventor's certificate listed below and have also identified below any foreign application for patent or inventor's certificate having a filing date before that of the application on which priority is claimed.

Prior Foreign Application(s)

NONE			Priority Claimed
(Number)	(Country)	(Day/Month/Year Filed)	☐ Yes ☐ No
☐			☐ Yes ☐ No
☐			☐ Yes ☐ No
☐			☐ Yes ☐ No

I hereby claim the benefit under Title 35, United States Code, § 120 of any United States application(s) listed below and, insofar as the subject matter of each of the claims of this application is not disclosed in the prior United States application in the manner provided by the first paragraph of Title 35, United States Code, § 112, I acknowledge the duty to disclose information which is material to patentability as defined in Title 37, Code of Federal Regulations, § 1.56 which became available between the filing date of the prior application and the national or PCT international filing date of this application.

NONE		
(Application Number)	(Filing Date)	(Status - patented, pending, abandoned)
☐		
☐		

I hereby appoint the following attorney(s) and/or agent(s) to prosecute this application and to transact all business in the Patent and Trademark Office connected therewith: Michael A. Beck, Reg. No. 40,907
James A. Giblin, Reg. No. 25, 772Address all telephone calls to James A. Giblin at telephone number (510) 705-7910Address all correspondence to James A. Giblin
Bayer Corporation
800 Dwight Way
Berkeley, CA 94701

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.

Full name of sole or first inventor (given name, family name) Steve RocznikInventor's signature [Signature] Date 5/10/00Residence Lafayette, California Citizenship CanadianPost Office Address 11 Hidden Valley Road
Lafayette, California 94549Full name of second joint inventor, if any (given name, family name) Nathalie A. Dubois-SrinofellowSecond inventor's signature [Signature] Date 5/10/00Residence Berkeley, California Citizenship FrancePost Office Address 1008 The Alameda
Berkeley, California 94707☒ Additional inventors are being named on separately numbered sheets attached hereto.

142
144

DECLARATION FOR PATENT APPLICATION

Docket Number (Optional)
MSB-7268

As a below named inventor, I hereby declare that:

My residence, post office address and citizenship are as stated below next to my name.

I believe I am the original, first and sole inventor (if only one name is listed below) or an original, first and joint inventor (if plural names are listed below) of the subject matter which is claimed and for which a patent is sought on the invention entitled METHOD OF REGULATING ANGIOGENESIS USING RYK PROTEIN, the specification of which

is attached hereto unless the following box is checked:

☐ was filed on _____ as United States Application Number or PCT International Application Number _____ and was amended on _____ (if applicable).

I hereby state that I have reviewed and understand the contents of the above identified specification, including the claims, as amended by any amendment referred to above.

I acknowledge the duty to disclose information which is material to patentability as defined in Title 37, Code of Federal Regulations, § 1.56.

I hereby claim foreign priority benefits under Title 35, United States Code, § 119 of any foreign application(s) for patent or inventor's certificate listed below and have also identified below any foreign application for patent or inventor's certificate having a filing date before that of the application on which priority is claimed.

Prior Foreign Application(s)

<u>NONE</u>				Priority Claimed ☐ Yes ☐ No
☐ (Number)	(Country)	(Day/Month/Year Filed)		☐ Yes ☐ No
☐ (Number)	(Country)	(Day/Month/Year Filed)		☐ Yes ☐ No
☐ (Number)	(Country)	(Day/Month/Year Filed)		☐ Yes ☐ No

I hereby claim the benefit under Title 35, United States Code, § 120 of any United States application(s) listed below and, insofar as the subject matter of each of the claims of this application is not disclosed in the prior United States application in the manner provided by the first paragraph of Title 35, United States Code, § 112, I acknowledge the duty to disclose information which is material to patentability as defined in Title 37, Code of Federal Regulations, § 1.56 which became available between the filing date of the prior application and the national or PCT International filing date of this application.

<u>NONE</u>			
☐ (Application Number)	(Filing Date)	(Status - patented, pending, abandoned)	
☐ (Application Number)	(Filing Date)	(Status - patented, pending, abandoned)	

I hereby appoint the following attorney(s) and/or agent(s) to prosecute this application and to transact all business in the Patent and Trademark Office connected therewith: Michael A. Beck, Reg. No. 40,807
James A. Giblin, Reg. No. 25, 772

Address all telephone calls to James A. Giblin at telephone number (510) 705-7810
Address all correspondence to James A. Giblin
Bayer Corporation
800 Dwight Way
Berkeley, CA 94701

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.

Full name of third joint inventor (given name, family name) Alya Zakatony
Third inventor's signature Alya Zakatony Date 5/10/00
Residence Oakland, California Citizenship U.S.
Post Office Address 1750 Arrowhead Drive
Oakland, California 94611
Full name of fourth joint inventor (given name, family name) _____
Fourth inventor's signature _____ Date _____
Residence _____ Citizenship _____
Post Office Address _____

☐ Additional inventors are being named on separately numbered sheets attached hereto.

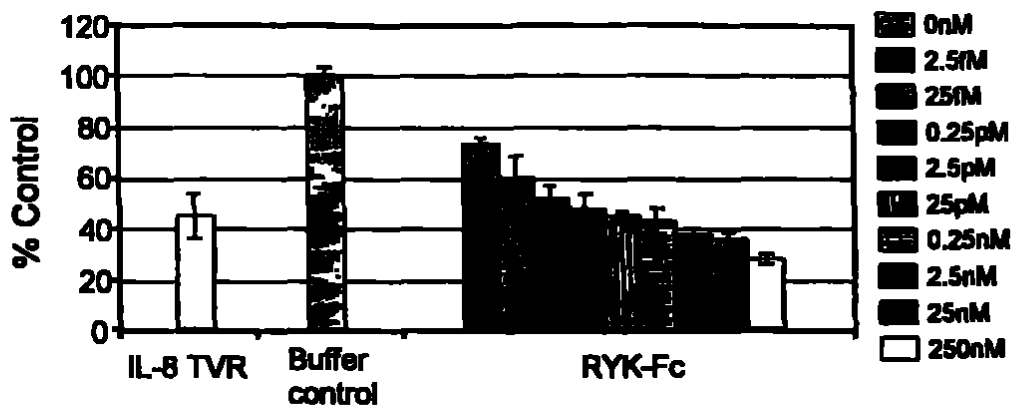


FIG._1A

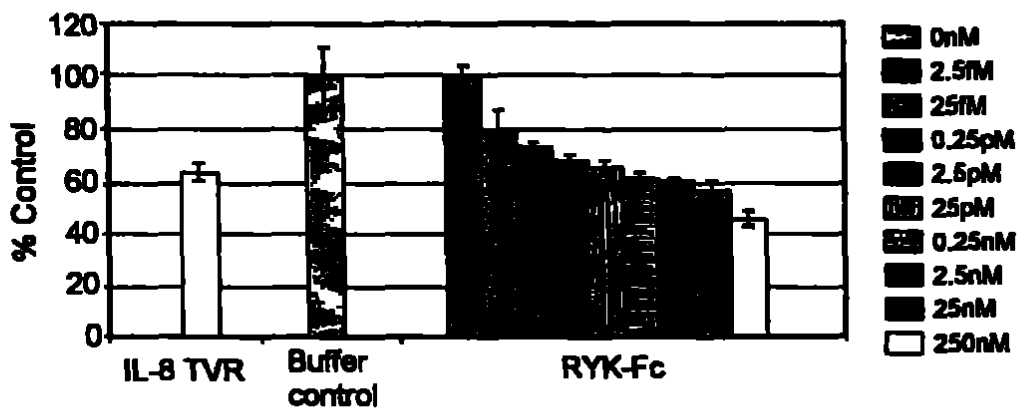


FIG._1B

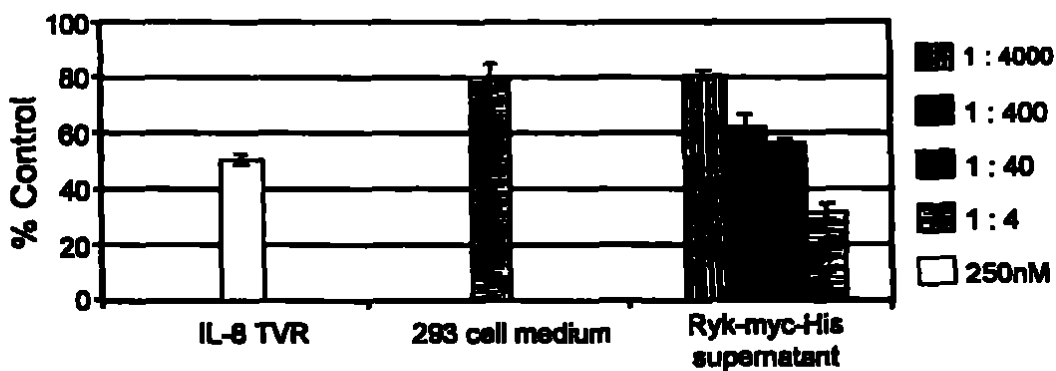


FIG._2

199
146

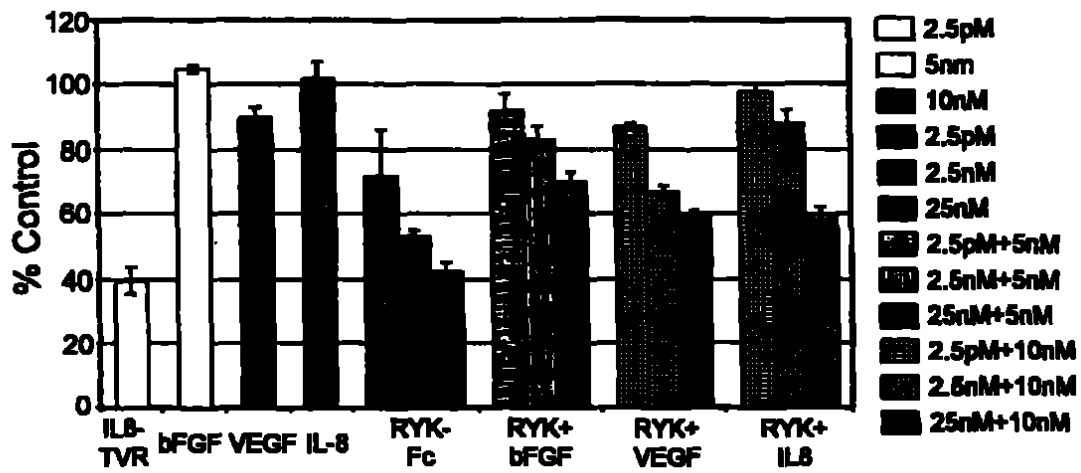


FIG._3

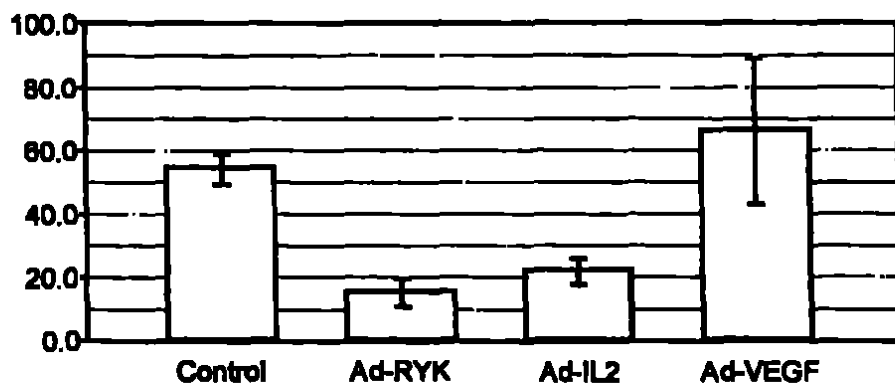


FIG._4

000150-EB2895 0

147

Patent MSB-7266

SEQUENCE LISTING

<110> Roczniak, Steve
Dubois-Stringfellow, Nathalie A.
Zolotorev, Alya

<120> Method of Regulating Angiogenesis Using Ryk Protein

<130> MSB-7266

<140>

<141>

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 161

<212> PRT

<213> human

<400> 1

Ala Pro Ala Pro Arg Pro Pro Glu Leu Gln Ser Ala Ser Ala Gly Pro
1 5 10 15
Ser Val Ser Leu Tyr Leu Ser Glu Asp Glu Val Arg Arg Leu Ile Gly
20 25 30
Leu Asp Ala Glu Leu Tyr Tyr Val Arg Asn Asp Leu Ile Ser His Tyr
35 40 45
Ala Leu Ser Phe Ser Leu Leu Val Pro Ser Glu Thr Asn Phe Leu His
50 55 60
Phe Thr Trp His Ala Lys Ser Lys Val Glu Tyr Lys Leu Gly Phe Gln
65 70 75 80
Val Asp Asn Val Leu Ala Met Asp Met Pro Gln Val Asn Ile Ser Val
85 90 95
Gln Gly Glu Val Pro Arg Thr Leu Ser Val Phe Arg Val Glu Leu Ser
100 105 110
Cys Thr Gly Lys Val Asp Ser Glu Val Met Ile Leu Met Gln Leu Asn
115 120 125
Leu Thr Val Asn Ser Ser Lys Asn Phe Thr Ala Leu Asn Phe Lys Arg
130 135 140
Arg Lys Met Cys Tyr Lys Lys Leu Glu Glu Val Lys Thr Ser Ala Leu
145 150 155 160
Asp Lys Asn Thr Ser Arg Thr Ile Tyr Asp Pro Val His Ala Ala Pro
165 170 175

09568783.051000

148

Thr Thr Ser Thr Arg
180

<210> 2
<211> 233
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Fc tag

<400> 2
Ala Ala Ala Asp Asp Asp Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
20 25 30
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
35 40 45
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
50 55 60
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
65 70 75 80
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
85 90 95
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
100 105 110
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Cys Gln
115 120 125
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
130 135 140
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
145 150 155 160
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
165 170 175
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
180 185 190
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
195 200 205
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

09568783.051000

572
149

Patent MSB-7266

210 215 220

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 3
<211> 46
<212> PRT
<213> human

<400> 3
Met Arg Gly Ala Ala Arg Leu Gly Arg Pro Gly Arg Ser Cys Leu Pro
1 5 10 15

Gly Ala Arg Gly Leu Arg Ala Pro Pro Pro Pro Pro Leu Leu Leu Leu
20 25 30

Leu Ala Leu Leu Pro Leu Leu Pro Ala Pro Gly Ala Ala Ala
35 40 45

<210> 4
<211> 607
<212> PRT
<213> human

<400> 4
Met Arg Gly Ala Ala Arg Leu Gly Arg Pro Gly Arg Ser Cys Leu Pro
1 5 10 15

Gly Ala Arg Gly Leu Arg Ala Pro Pro Pro Pro Pro Leu Leu Leu Leu
20 25 30

Leu Ala Leu Leu Pro Leu Leu Pro Ala Pro Gly Ala Ala Ala Pro
35 40 45

Ala Pro Arg Pro Pro Glu Leu Gln Ser Ala Ser Ala Gly Pro Ser Val
50 55 60

Ser Leu Tyr Leu Ser Glu Asp Glu Val Arg Arg Leu Ile Gly Leu Asp
65 70 75 80

Ala Glu Leu Tyr Tyr Val Arg Asn Asp Leu Ile Ser His Tyr Ala Leu
85 90 95

Ser Phe Ser Leu Leu Val Pro Ser Glu Thr Asn Phe Leu His Phe Thr
100 105 110

Trp His Ala Lys Ser Lys Val Glu Tyr Lys Leu Gly Phe Gln Val Asp
115 120 125

Asn Val Leu Ala Met Asp Met Pro Gln Val Asn Ile Ser Val Gln Gly
130 135 140

09568783 - 51000

Glu Val Pro Arg Thr Leu Ser Val Phe Arg Val Glu Leu Ser Cys Thr
 145 150 155 160
 Gly Lys Val Asp Ser Glu Val Met Ile Leu Met Gln Leu Asn Leu Thr
 165 170 175
 Val Asn Ser Ser Lys Asn Phe Thr Ala Leu Asn Phe Lys Arg Arg Lys
 180 185 190
 Met Cys Tyr Lys Lys Leu Glu Glu Val Lys Thr Ser Ala Leu Asp Lys
 195 200 205
 Asn Thr Ser Arg Thr Ile Tyr Asp Pro Val His Ala Ala Pro Thr Thr
 210 215 220
 Ser Thr Arg Val Phe Tyr Ile Ser Val Gly Val Cys Cys Ala Val Ile
 225 230 235 240
 Phe Leu Val Ala Ile Ile Leu Ala Val Leu His Leu His Asn Met Lys
 245 250 255
 Arg Ile Glu Leu Asp Asp Ser Ile Ser Ala Ser Ser Ser Ser Gln Gly
 260 265 270
 Leu Ser Gln Pro Ser Thr Gln Thr Thr Gln Tyr Leu Arg Ala Asp Thr
 275 280 285
 Pro Asn Asn Ala Thr Pro Ile Thr Ser Tyr Pro Thr Leu Arg Ile Glu
 290 295 300
 Lys Asn Asp Leu Arg Ser Val Thr Leu Leu Glu Ala Lys Gly Lys Val
 305 310 315 320
 Lys Asp Ile Ala Ile Ser Arg Glu Arg Ile Thr Leu Lys Asp Val Leu
 325 330 335
 Gln Glu Gly Thr Phe Gly Arg Ile Phe His Gly Ile Leu Ile Asp Glu
 340 345 350
 Lys Asp Pro Asn Lys Glu Lys Gln Ala Phe Val Lys Thr Val Lys Asp
 355 360 365
 Gln Ala Ser Glu Ile Gln Val Thr Met Met Leu Thr Glu Ser Cys Lys
 370 375 380
 Leu Arg Gly Leu His His Arg Asn Leu Leu Pro Ile Thr His Val Cys
 385 390 395 400
 Ile Glu Glu Gly Glu Lys Pro Met Val Ile Leu Pro Tyr Met Asn Trp
 405 410 415
 Gly Asn Leu Lys Leu Phe Leu Arg Gln Cys Lys Leu Val Glu Ala Asn
 420 425 430
 Asn Pro Gln Ala Ile Ser Gln Gln Asp Leu Val His Met Ala Ile Gln

153

151

Patent MSB-7266

435	440	445
Ile Ala Cys Gly Met Ser Tyr Leu Ala Arg Arg Glu Val Ile His Lys		
450	455	460
Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Val Ile Asp Asp Thr Leu Gln Val Lys		
465	470	475
Ile Thr Asp Asn Ala Leu Ser Arg Asp Leu Phe Pro Met Asp Tyr His		
485	490	495
Cys Leu Gly Asp Asn Glu Asn Arg Pro Val Arg Trp Met Ala Leu Glu		
500	505	510
Ser Leu Val Asn Asn Glu Phe Ser Ser Ala Ser Asp Val Trp Ala Phe		
515	520	525
Gly Val Thr Leu Trp Glu Leu Met Thr Leu Gly Gln Thr Pro Tyr Val		
530	535	540
Asp Ile Asp Pro Phe Glu Met Ala Ala Tyr Leu Lys Asp Gly Tyr Arg		
545	550	555
Ile Ala Gln Pro Ile Asn Cys Pro Asp Glu Leu Phe Ala Val Met Ala		
565	570	575
Cys Cys Trp Ala Leu Asp Pro Glu Glu Arg Pro Lys Phe Gln Gln Leu		
580	585	590
Val Gln Cys Leu Thr Glu Phe His Ala Ala Leu Gly Ala Tyr Val		
595	600	605

<210> 5
 <211> 414
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: fusion of human protein fragment and Fc tag

<400> 5
 Ala Pro Ala Pro Arg Pro Pro Glu Leu Gln Ser Ala Ser Ala Gly Pro
 1 5 10 15
 Ser Val Ser Leu Tyr Leu Ser Glu Asp Glu Val Arg Arg Leu Ile Gly
 20 25 30
 Leu Asp Ala Glu Leu Tyr Tyr Val Arg Asn Asp Leu Ile Ser His Tyr
 35 40 45
 Ala Leu Ser Phe Ser Leu Leu Val Pro Ser Glu Thr Asn Phe Leu His
 50 55 60

09568783-051000

152

Protein MSB-7766

Phe Thr Trp His Ala Lys Ser Lys Val Glu Tyr Lys Leu Gly Phe Gln
65 70 75 80

Val Asp Asn Val Leu Ala Met Asp Met Pro Gln Val Asn Ile Ser Val
85 90 95

Gln Gly Glu Val Pro Arg Thr Leu Ser Val Phe Arg Val Glu Leu Ser
100 105 110

Cys Thr Gly Lys Val Asp Ser Glu Val Met Ile Leu Met Gln Leu Asn
115 120 125

Leu Thr Val Asn Ser Ser Lys Asn Phe Thr Ala Leu Asn Phe Lys Arg
130 135 140

Arg Lys Met Cys Tyr Lys Lys Leu Glu Glu Val Lys Thr Ser Ala Leu
145 150 155 160

Asp Lys Asn Thr Ser Arg Thr Ile Tyr Asp Pro Val His Ala Ala Pro
165 170 175

Thr Thr Ser Thr Arg Ala Ala Ala Asp Asp Asp Asp Lys Thr His Thr
180 185 190

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
195 200 205

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
210 215 220

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
225 230 235 240

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
245 250 255

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
260 265 270

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
275 280 285

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
290 295 300

Lys Ala Lys Cys Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
305 310 315 320

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
325 330 335

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
340 345 350

09568783.051 00

153

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
355 360 365

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
370 375 380

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
385 390 395 400

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
405 410

<210> 6
<211> 218
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: fusion of human
protein fragment and myc-His tag

<400> 6
Ala Pro Ala Pro Arg Pro Pro Glu Leu Gln Ser Ala Ser Ala Gly Pro
1 5 10 15

Ser Val Ser Leu Tyr Leu Ser Glu Asp Glu Val Arg Arg Leu Ile Gly
20 25 30

Leu Asp Ala Glu Leu Tyr Tyr Val Arg Asn Asp Leu Ile Ser His Tyr
35 40 45

Ala Leu Ser Phe Asn Leu Leu Val Pro Ser Glu Thr Asn Phe Leu His
50 55 60

Phe Thr Trp His Ala Lys Ser Lys Val Glu Tyr Lys Leu Gly Phe Gln
65 70 75 80

Val Asp Asn Val Leu Ala Met Asp Met Pro Gln Val Asn Ile Ser Val
85 90 95

Gln Gly Glu Val Pro Arg Thr Leu Ser Val Phe Arg Val Glu Leu Ser
100 105 110

Cys Thr Gly Lys Val Asp Ser Glu Val Met Ile Leu Met Gln Leu Asn
115 120 125

Leu Thr Val Asn Ser Ser Lys Asn Phe Thr Ala Leu Asn Phe Lys Arg
130 135 140

Arg Lys Met Cys Tyr Lys Lys Leu Glu Glu Val Lys Thr Ser Ala Leu
145 150 155 160

Asp Lys Asn Thr Ser Arg Thr Ile Tyr Asp Pro Val His Ala Ala Pro
165 170 175

000T50-EB789560

AFB
154

Patent MSB-7266

Thr Thr Ser Thr Arg Val Phe Tyr Ile Ser Val Gly Val Cys Cys Leu
180 185 190
Glu Ser Arg Gly Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn
195 200 205
Ser Ala Val Asp His His His His His His
210 215

<210> 7
<211> 51
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:illustrative
random sequence

<400> 7
Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Ala Asn Pro Gln Leu
1 5 10 15
Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu
20 25 30
Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln
35 40 45
Val Leu Phe
50

<210> 8
<211> 52
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:illustrative
random sequence

<400> 8
Arg Ala Pro Phe Lys Lys Ser Trp Ala Tyr Leu Gln Val Ala Lys His
1 5 10 15
Lys Leu Ser Trp Asn Lys Asp Gly Ile Leu His Gly Val Arg Tyr Gln
20 25 30
Asp Gly Asn Leu Val Ile Gln Phe Pro Gly Leu Tyr Phe Ile Ile Cys
35 40 45

09568783-051000

155

Gln Leu Gln Phe
50

<210> 9
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: FLAG marker peptide

<400> 9
Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 10
<211> 1383
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: fusion of human cDNA and Fc tag coding sequence

<400> 10
atgctgtggg cggcgcggtt gggcgggcgg ggccggagtt gcctcccggg ggcccgcggc 60
ctgagggccc cgccgcccgc gccgctgctg cttctgcttg cgctgttgcc gctgctgccc 120
ggccttgggc ctgcccgcgc ccccgcccgc cggcccccgc agctgcagtc ggcttccgcg 180
gggcccagcg tgagtcctta cctgagcgag gacgaggtgc gccggctgat cggctctgat 240
gcagaaacttt attatgtgag aaatgacctt attagtcact acgctctatc ctttaattctg 300
ttagtaccca gtgagacaaa ttctctgcac ttcacctggc atgcgaagtc caaggttgaa 360
tataagctgg gattccaagt ggacaatgtt ttggcaatgg atatgcccc ggtcaacatt 420
tctgttcagg gggaaagtcc acgcacttta tcagtgttcc gggtagagcc ttcctgtact 480
ggcaaaagtag attctgaagt tatgatacta atgcagctca acttgacagt aaattcttca 540
aaaaatttta ccgtctttaa ttttaaacga aggaatgtgt gctacaaaaa acttgaagaa 600
gtaaaaactt cagccttggg caaaaacact agcagaacta tttatgatcc tgtacatgca 660
gctccaacca cttctacgcg tgcggccgca gatgatgat acaaaactca cacatgcccc 720
ccgtgcccag cactctgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc 780
aaggaccccc tcatgatctc ccggacccct gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc 840
cacgaagacc ctgaggtcaa gttnaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 900
aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc 960
gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaagggtctc caacaaagcc 1020
ctcccagccc ccctcagaaa aacctctccc aaagccaaag gccagccccg agaaccacag 1080
gtgtaccccc tgcccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc 1140
ctggtcaaa gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 1200
gagaacaact acaagaccac gctcccggtg ctggactccg acggctcctt cttcctctac 1260
agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 1320
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1380
tga 1383

095 8783-05100

156

<210> 11
<211> 795
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: fusion of human
cDNA and myc-His tag coding sequence

<400> 11
atgctgtgggg cggcgcggtt ggggcggcgg ggccggagtt gcctcccggg ggcccgcggc 60
ctgagggccc cggcgccgcc gccgctgctg cttctgcttg cgctgttgcc gctgctgccc 120
ggccttggtg ctgcccggcg ccccgccccg cggccccggg agctgcagtc ggcttccggc 180
gggcccagcg tgagtctcta cctgagcgag gacgaggtgc gccggctgat cggctctgat 240
gcagaacttt attatgtgag aaatgacctt attagtcact acgctctatc ctttaatctg 300
ttagtaccga gtgagacaaa tttcctgcac ttcacctggc atgcgaagtc caagggtgaa 360
tataagctgg gattccaagt ggacaatgtt ttggcaatgg atatgccccg ggtcaacatt 420
tctgttcagg gggaagttcc acgcacttta tcagtgtttc gggtagagct ttcctgtact 480
ggcaaagtag attctgaagt tatgatacta atgcagctca acttgacagt aaattcttca 540
aaaaatttta ccgtctttaa ttttaaacga aggaanaatgt gctacaaaaa acttgaagaa 600
gtaaaaactt cagccttggg caaaaacact agcagaacta tttatgatcc tgtacatgca 660
gctccaacca cttctacgag tgtgttttat attagtgtag gggtttgttg tctcgagtct 720
agagggcccg aacaaaaact catctcagaa gaggatctga atagcgccgt cgaccatcat 780
catcatcatc attga 795

<210> 12
<211> 27
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: myc-his tag
peptide sequence

<400> 12
Leu Glu Ser Arg Gly Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
1 5 10 15
Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
20 25

058783.051000



157
157

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO

Radicacion : 01036462 00000000

Folios: 160

Fecha (AMD): 2001-05-09 17:00:23

Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 01 - 21,051
FECHA : ABRIL 2 DE 2001

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	2749343	02/04/2001	17,100,960.00

***** C O N C E P T O *****

CANT. REMISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 30005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	356,640.00
	TOTAL :	\$ 356,640.00

SOM: TRESCIENTOS CINCUENTA Y SEIS MIL SEISCIENTOS CUARENTA PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 350 5220
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia



140
158

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

NIT : 804

Radicacion : 01035462 00000000

Folios: 160

Fecha (AMD): 2001-03-09 17:00:23

Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 01 - 16,205
FECHA : MARZO 12 DE 2001

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	2749335	12/03/2001	36,451,460.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 30005-01-01 SOLICITUDES	82 INVOCACION DE UNA PRIORIDAD EN NU	100,000.00
	TOTAL :	\$ 100,000.00

SON: CIENTO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador: 382 0840
Fax: 350 5220
e-mail: Info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE

PATENTE DE INVENCION []

MODELO DE UTILIDAD []

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente []
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- Descripción de la invención []
- Dibujos de ser estos pertinentes []
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. []
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño. []
- Comprobante de pago de las tasas establecidas. []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de trazado. []
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. []
- Representación gráfica del esquema de trazado []
- Comprobante de pago de las tasas establecidas. []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Firma Responsable

Fecha: _____

2020
Bogotá, D.C.

Doctor
EMILIO FERRERO
Apoderado

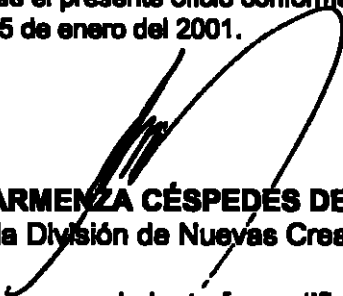
REFERENCIA:	Radicación No.	01-38462
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	430
	Oficio No.	1712
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica que:

- Debe allegar copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente otorgado por el inventor al solicitante o a su causante (art. 26-k, Dec 486/2000).
- No obstante haber recepcionado copia de la prioridad reivindicada, es conveniente allegar traducción simple, por lo menos de las reivindicaciones de la misma.

En cumplimiento del artículo 39 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el artículo 8 de la Resolución Reglamentaria No. 210 del 15 de enero del 2001.


ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

07 JUN. 2001-

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____.

202027/202022

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador: 382 0840
Fax: 382 2695
E-mail: Info@slc.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia