



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 324**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/00 (2006.01)

G01N 31/00 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07018743 .0**

96 Fecha de presentación : **22.02.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1878799**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.01.2008**

54 Título: **Procedimientos de cribado de agentes para actividad usando teleósteos.**

30 Prioridad: **23.02.1998 US 75783 P**
18.09.1998 US 100950 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.11.2011

73 Titular/es: **PHYLONIX PHARMACEUTICALS Inc.**
100 Inman Street
Cambridge, Massachusetts 02139, US

72 Inventor/es: **Serbedzija, George N.;**
Semino, Carlos y
Frost, Deanna

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

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

DESCRIPCIÓN

Procedimientos de cribado de agentes para actividad usando teleósteos

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0001] En la actualidad, las búsquedas de compuestos terapéuticos y profilácticos de dianas específicas que tienen la capacidad para mejorar o inhibir la actividad de la angiogénesis, mejorar o inhibir la actividad de la muerte celular, y/o presentan baja toxicidad comprenden tres principales focos de descubrimiento y desarrollo de fármacos. La angiogénesis juega un papel importante no sólo en el desarrollo de la vascularización embrionaria, sino también en muchos procesos de post-natales, tales como la cicatrización de heridas y tejidos y la regeneración de órganos. La angiogénesis también ha sido identificada como un proceso crítico para el crecimiento de tumores sólidos. Además, la proliferación incontrolada de células sanguíneas y una angiogénesis excesiva se han demostrado que constituyen componentes patogénicos importantes en numerosas enfermedades, incluyendo artritis reumatoide, aterosclerosis, diabetes mellitus, retinopatías, psoriasis, y fibroplasia retrolental.

[0002] Los procedimientos de cribado de agentes para una capacidad de inhibir o mejorar la actividad de la angiogénesis podrían ser útiles en la identificación de aquellos agentes que podrían ser efectivos en el tratamiento terapéutico o profiláctico de una variedad de enfermedades que afectan a los procesos de angiogénesis. Por ejemplo, la inhibición de la angiogénesis es un poderoso enfoque potencial para aminorar el cáncer (Folkman, New Eng. J. Med. 333:1757-1763 (1995); Kerbel, Nature 390:355 (1997)) y para la pérdida de inversión de los vasos sanguíneos asociados con isquemia tisular, tal como la retinopatía diabética (Bonn, Lancet 348:604 (1996); Breier et al., Haemist 78 (1):678-683 (1997). Parece que las terapias anti-angiogénicas no provocan resistencia adquirida de los fármacos (Boehm et al, Nature 390:404-407 (1997)) - un gran problema con las terapias actuales contra el cáncer. Sin embargo, existen pocas moléculas candidatas terapéuticas. Por lo tanto, sería deseable proporcionar procedimientos para identificar compuestos que inhiben la angiogénesis y tengan actividades terapéuticas contra enfermedades que podrían beneficiarse de la inhibición de la angiogénesis, tal como el cáncer y la diabetes. De manera similar, los procedimientos de cribado de compuestos que mejoran la angiogénesis mediante la estimulación de la formación de vasos sanguíneos sería una ventaja para su uso en enfoques mínimamente invasivos para mejorar la función circulatoria en varias enfermedades, tales como enfermedad arterial coronaria, insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad arterial periférica y enfermedad venosa periférica. Desafortunadamente, muchos ensayos actuales para la angiogénesis no permiten la evaluación *in vivo* de los compuestos o sus efectos secundarios en modelos animales completos, o en múltiples tejidos u órganos de modelos animales simultáneamente y a lo largo del tiempo. Además, muchos de los ensayos actuales para la actividad de la angiogénesis no son adecuados para el cribado de compuestos rápido, automatizado, o extensivo, particularmente el cribado de librerías de compuestos que contienen numerosos compuestos, debido a su complejidad.

[0003] La búsqueda de compuestos que puedan regular la promoción o inhiban la muerte celular también ha sido de vital interés. La necrosis y la apoptosis son dos tipos conocidos de muerte celular. La necrosis implica la muerte patológica de tejido vivo en un sujeto debido a daños no fisiológicos en las células de los tejidos. La apoptosis, que implica la muerte celular programada, es un proceso fisiológico que asegura que se mantiene un equilibrio entre la proliferación y la diferenciación celular en la mayoría de los tejidos auto-regenerativos de los organismos multicelulares. La regulación de la actividad de la muerte celular (apoptosis en particular) constituye un mecanismo importante en los enfoques terapéuticos y profilácticos para muchas enfermedades, incluyendo, *por ejemplo*, el cáncer y el trasplante de órganos. Los modelos existentes para evaluar la actividad de la apoptosis incluyen el gusano nematodo, *C. elegans*. Aunque el nematodo tiene muchas ventajas como un sistema modelo, no es el modelo óptimo para la evaluación de la actividad de la muerte celular en los vertebrados o para su uso en el cribado de compuestos de potencial actividad terapéutica en los vertebrados.

[0004] Actualmente hay dos enfoques para detectar la actividad de la muerte celular en huéspedes vertebrados. El primer enfoque utiliza técnicas de cultivo de células estándar y típicamente se basa en lectores de microplacas estándar para detectar la muerte de las células cultivadas a partir de un organismo. Una gran desventaja del formato de ensayo del cultivo celular es que no permite un análisis de los efectos de un compuesto en tipos de células que no han sido cultivadas (*es decir*, otros tipos de células). Tampoco permite una evaluación de los efectos de un compuesto en los tejidos u órganos específicos o en un huésped completo intacto *in vivo*. Además, este formato de ensayo no permite la monitorización de las actividades de la muerte celular en múltiples tejidos, órganos o sistemas de un huésped vivo de manera simultánea o la monitorización continua de tales actividades a lo largo del tiempo. Además, el enfoque de ensayo de cultivo de células no permite un cribado rápido y automatizado de alto rendimiento de muchos compuestos.

[0005] Un segundo enfoque para detectar la actividad de la muerte celular utiliza una técnica de tinción histoquímica, etiquetado final de nucleótidos de desoxiuridina de terminal designado (TUNEL), para detectar las células muertas o moribundas en tejidos seccionados de embriones de vertebrados. Desafortunadamente, con este enfoque, solamente un único punto en el tiempo en el ciclo de vida del huésped puede ser examinado; la muerte de células en diferentes tejidos u órganos del sujeto durante un período de tiempo no se puede monitorizar. Debido a que muchas enfermedades degenerativas se producen en etapas, la capacidad de examinar los cambios en el patrón de la actividad de la muerte celular causada por un compuesto y la duración de los efectos directos y secundarios de los compuestos

en múltiples tejidos y órganos representaría una mejora significativa sobre estos procedimientos. Por otra parte, debido a que el enfoque TUNEL requiere que las células se fijen para su visualización, los efectos en un animal vivo no pueden ser monitorizados.

[0006] La identificación de compuestos terapéuticos y profilácticos para dianas específicas que presentan baja toxicidad y/o efectos secundarios ha sido también el centro de descubrimiento y desarrollo de fármacos. La evaluación del impacto potencial de diferentes compuestos en los seres humanos y en la salud animal es un componente importante de la evaluación de riesgos. Existe una creciente preocupación de que los actuales procedimientos de ensayo de toxicidad sean insuficientes. Una serie de cribados de toxicidad *in vitro* basados en células se han desarrollado. Significativamente, sin embargo, estos cribados no permiten la evaluación de los efectos tóxicos de un compuesto *in vivo* en un animal intacto. En particular, estos ensayos basados en células han sido diseñados a nivel molecular y celular, y como resultado, la determinación del impacto de un compuesto de interés en niveles más altos de la organización celular, tales como el sistema circulatorio y neurológico, aún requiere pruebas posteriores en el animal completo. Además, los cribados actuales no permiten la evaluación de los efectos de los fármacos en todas las células, tejidos u órganos diana potenciales de un animal. Tampoco pueden los efectos de un compuesto en múltiples tejidos y órganos diana estudiarse simultáneamente o a lo largo del tiempo utilizando los ensayos actuales. Subrayando la necesidad de desarrollo de procedimientos de cribado de toxicidad más predictivos y comprensivos, muchos compuestos que pasan las pruebas preliminares basadas en células no superan las pruebas definitivas de toxicidad en animales, un requisito previo para su eventual aprobación por parte de la FDA. Además, algunos compuestos terapéuticos potenciales que no producen una mortalidad inmediata inducen efectos tóxicos en órganos y tejidos específicos. Hay una necesidad de procedimientos comprensivos y rentables para el cribado de compuestos para la actividad tóxica en animales completos y en uno o más tejidos diana designados y en órganos *in vivo* y en células *in vitro* y a lo largo del tiempo.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

[0007] La presente invención se refiere en general a procedimientos de cribado de un agente para una actividad en un teleosteo. En un aspecto, se proporcionan procedimientos de cribado de un agente para una actividad de la angiogénesis *in vivo* o *in vitro*. Algunos procedimientos comprenden la administración del agente a un teleosteo completo *in vivo* y la detección de una respuesta en el teleosteo, o por lo menos en un tejido u órgano del teleosteo que indique la actividad de la angiogénesis. Otros procedimientos incluyen la administración del agente a las células de un teleosteo *in vitro* y la detección de una respuesta en las células, que indique la actividad de la angiogénesis. En algunos procedimientos, la respuesta es una reducción en la formación de vasos sanguíneos en relación con un teleosteo sin tratar. En otros procedimientos, la respuesta es un aumento de la formación de vasos sanguíneos en relación con un teleosteo sin tratar.

[0008] En otro aspecto, la invención proporciona procedimientos de cribado de un agente para un efecto sobre la actividad de la muerte celular *in vivo* o *in vitro*. Algunos procedimientos comprenden la administración del agente a un teleosteo completo *in vivo* y la detección de una respuesta en el teleosteo o en por lo menos un tejido u órgano del teleosteo o células del mismo que indique un efecto sobre la actividad de muerte celular. Algunos procedimientos comprenden la administración del agente a las células de un teleosteo *in vitro* y la detección de una respuesta en la célula, que indique un efecto sobre la actividad de muerte celular. En algunos procedimientos, la respuesta es un aumento de la actividad de muerte celular. En otros procedimientos, la respuesta es una disminución de la actividad de muerte celular. La actividad de la muerte celular puede comprender la actividad de apoptosis o necrosis. En algunos procedimientos, un tinte fluorescente que etiqueta las células muertas o moribundas se administra para facilitar la detección de la actividad de muerte celular. En algunos procedimientos, el tinte fluorescente se administra a los teleosteos antes de la administración del agente. En algunos procedimientos, el tinte fluorescente es un tinte de cianina asimétrica, tal como un tinte de quinolina.

[0009] También se proporcionan procedimientos de cribado de un agente tóxico para la actividad *in vivo* o *in vitro*. Algunos procedimientos comprenden la administración del agente a un teleosteo completo *in vivo* y la detección de una respuesta en el teleosteo, o por lo menos en un tejido u órgano del teleosteo que indique la toxicidad. Otros procedimientos incluyen la administración del agente *in vitro* en células de un teleosteo y la detección de una respuesta en las células que indique la toxicidad. En algunos procedimientos, la respuesta es detectada en dos o más órganos del teleosteo simultáneamente.

[0010] En otro aspecto, la presente invención proporciona procedimientos de cribado de un agente para la actividad de la angiogénesis y la toxicidad *in vivo* o *in vitro*. Algunos procedimientos comprenden la administración del agente a un teleosteo completo *in vivo* y la detección de una respuesta en el teleosteo que indique la actividad de la angiogénesis y/o toxicidad. Otros procedimientos incluyen la administración del agente *in vitro* en células de un teleosteo y la detección de una respuesta en las células que indique la actividad de la angiogénesis y/o toxicidad.

[0011] En otro aspecto, la presente invención incluye procedimientos de cribado de un agente para la actividad de la angiogénesis y un efecto sobre la actividad de la muerte celular *in vivo* o *in vitro*. Algunos procedimientos comprenden la administración del agente a un teleosteo *in vivo* y la detección de una respuesta en el teleosteo que indique la actividad de la angiogénesis y/o un efecto sobre la actividad de muerte celular. Otros procedimientos incluyen la administración del agente *in vitro* en células de un teleosteo y la detección de una respuesta en las células que

indique la actividad de la angiogénesis y/o un efecto sobre la actividad de muerte celular.

[0012] La presente invención también incluye procedimientos de cribado de un agente para un efecto sobre la actividad de la muerte celular y la actividad tóxica *in vitro* o *in vivo*. Algunos procedimientos comprenden la administración del agente *in vivo* a un teleosteo y la detección de una respuesta en el teleosteo que indique un efecto sobre la actividad de la muerte celular y/o toxicidad. Otros procedimientos incluyen la administración del agente *in vitro* en células de un teleosteo y la detección de una respuesta en las células que indique un efecto sobre la actividad de la muerte celular y/o toxicidad.

[0013] Una mayor comprensión de la naturaleza y las ventajas de la presente invención puede entenderse con referencia a la descripción detallada de la memoria y las figuras adjuntas.

10 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

[0014]

La figura 1 es un diagrama esquemático que muestra los procesos de vasculogénesis y angiogénesis.

Las figuras 2A, 2B y 2C son fotografías a través de un microscopio de disección que muestran vistas laterales de embriones de pez cebra a las 72 horas (h) de desarrollo. Los embriones se han teñido con fosfatasa alcalina (AP). Los vasos sanguíneos se visualizan por microscopía de luz después de la tinción de fosfatasa alcalina. Un embrión de control (figura 2A) tratado con 0,1% dimetilsulfóxido (DMSO) tiene una morfología y formación de vasos normales. Los vasos subintestinales (SIV) (flecha) están en el patrón característico. Un embrión tratado con un derivado de la fumagilina a una concentración de 10 micromolar (μM) (figura 2B) muestra un retraso en el desarrollo (reducción del tamaño de la aleta y en la longitud axial) y la pérdida de los SIV (flecha). El conducto pronefrico proporciona un control positivo para la tinción de AP (cabeza de la flecha). Un embrión tratado con un derivado de la fumagilina a una concentración de 100 μM (figura 2C) está muerto. Los derivados de la fumagilina inducen retraso en el desarrollo y la respuesta tóxica en los embriones. El ojo (E), el vitelo (Y) y la aleta (F) de los embriones están etiquetados para orientación. Barra de escala = 100 μm .

Las figuras 3A y 3B son fotografías a través de un microscopio de disección que muestra dos vistas laterales de embriones de pez cebra a las 72 horas de desarrollo. Cada embrión se ha teñido con fosfatasa alcalina. La figura 3A representa un control; la figura 3B muestra unos embriones tratados con un compuesto de la librería del NCI. Ambos embriones son morfológicamente normales, sin embargo, el embrión tratado no formó ningún SIV (flecha) y muestra una pérdida específica de los vasos subintestinales. El ojo (E), el vitelo (Y) y la aleta (F) de los embriones están etiquetados para orientación. Barra de escala = 100 μm .

La figura 4 es una fotografía a través de un microscopio de disección de una vista lateral de un embrión de pez cebra teñido con fosfatasa alcalina a las 72 horas de desarrollo. El embrión ha sido tratado con un compuesto que induce truncamiento, edema pericárdico (flecha), y reducción de la formación del SIV (cabeza de la flecha). Se muestra una pérdida de vasos laterales en la cesta SIV. El ojo (E), el vitelo (Y) y la aleta (F) del embrión están etiquetados para orientación. Barra de escala = 100 μm .

La figura 5 es una fotografía a través de un microscopio de disección que muestra una vista lateral de un embrión de pez cebra tratado con un compuesto que induce vesiculación del notocordio (flecha), pero no efectúa la formación de SIV (cabeza de la flecha). El embrión se ha teñido con AP. Los defectos axiales no efectúan usualmente la angiogénesis. El ojo (E), el vitelo (Y) y la aleta (F) del embrión están etiquetados para orientación. Barra de escala = 100 μm .

Las figuras 6A-6D son fotografías a través de un microscopio de disección que muestran vistas laterales de embriones de pez cebra a las 72 horas de desarrollo. Los embriones se han teñido con AP. Cuando se inyectó VEGF en el vitelo de un embrión (figuras 6A y 6C), se observaron dos fenotipos angiogénicos: 1) la aparición de puntos largos que sobresalen de la canasta de los vasos subintestinales (flechas largas), y 2) aumento de los diámetros de los en el canasta subintestinal (puntas de la flecha). Cuando el VEGF se inyecta en el espacio perivitelino (figura 6D) de un embrión, se observó la fusión de vasos mayores, la formación inadecuada de vasos (flecha), así como defectos en el corazón (flecha larga) y de desarrollo. El control de los embriones (figura 6B), en los que se inyectó tampón en el vitelo del espacio perivitelino era normal. El ojo (E), el vitelo (Y) y la aleta (F) de los embriones están etiquetados para orientación. Barra de escala = 100 μm .

La figura 7 es una fotografía a través de un microscopio compuesto (objetivo 10x) de una tinción de fosfatasa alcalina de embriones de pez cebra en el tercer día de desarrollo. Estas vistas dorsales de un embrión no tratado (arriba) y uno tratado (parte inferior) muestran el efecto del fármaco anti-angiogénesis, Ovicillin, en las venas subintestinales (flechas). Además de causar una reducción en los vasos subintestinales, el fármaco tenía otros efectos, entre ellos causando edema pericárdico (puntas de la flecha). En esta figura, la letra "E" se refiere a los ojos, y la letra "Y" indica el vitelo.

La figura 8 es una fotografía a través de un microscopio compuesto (objetivo 20x), que muestra un hibridación completa de ARN *in situ* con *flk-1* realizada en un embrión de pez cebra de un día. En esta vista lateral del tronco, los vasos intersomáticos (flechas), que surgen de la aorta dorsal (A), se etiquetan con la sonda. El anterior está en la izquierda y el

dorsal está arriba.

La figura 9 es una microangiografía que muestra el perfil lateral de un embrión de pez cebra en el tercer día de desarrollo, que representa el patrón vascular normal, incluyendo el cráneo (C), los vasos intersegmentales (I) y subintestinales(s). La letra "H" se refiere al corazón, y la letra "E" se refiere a los ojos. Los datos para construir la microangiografía fueron adquiridos a partir de un microscopio de epifluorescencia y procesados utilizando software de procesamiento digital de imagen.

Las figuras 10A y 10B son fotografías de microscopio compuesto (objetivo 10x) bajo un microscopio compuesto que muestra, respectivamente, una imagen de fase de un embrión de pez cebra normal (figura 10A) y un embrión de pez cebra tratado con ácido retinoico (figura 10B). El embrión tratado con ácido retinoico (ácido de vitamina A, Sigma Chemical Co.) fue expuesto a 1 μM de ácido retinoico (AR) de 12 a 14 horas. La apoptosis se produjo en la parte posterior del cerebro del embrión tratados con AR, tal como lo demuestra la desorganización de la parte posterior del cerebro y la reducción significativa de la distancia entre la vesícula ótica y el ojo en el embrión tratado con ácido retinoico, en comparación con el embrión normal (comparar las flechas en las figuras 10A y 10B). La letra "E" se refiere a los ojos, las letras "YB" significan el vitelo, y las letras "OT" denotan la vesícula ótica.

La figura 11 es una fotografía a través de un microscopio de disección que muestra una vista lateral de un embrión de pez cebra de 5 días teñido con estreptavidina conjugada con peroxidasa. Tanto en el hígado (flechas) como el intestino (G) se tiñen. El ojo (E) y la vesícula ótica (OV) de los embriones están etiquetados para la orientación. El aumento es comparable a las figuras 12A y 12B.

Las figuras 12A y 12B son fotografías a través de un microscopio de disección, que muestran la respuesta a las dosis de los embriones de pez cebra a los que se había administrado dosis específicas de dexametasona. Los embriones de pez cebra fueron tratados durante cinco días con dexametasona para determinar el efecto de la dexametasona sobre el desarrollo del hígado y su función. Los embriones fueron fijados con paraformaldehído y se incubaron con estreptavidina-peroxidasa para detectar el hígado después de la incubación con un tinte cromogénico. Las flechas indican la posición del hígado. La figura 12A (arriba), embrión no tratado con seis días de vida (embrión de control), la figura 12B (abajo), embrión con seis días de vida tratado con 100 μM de dexametasona durante cinco días. Los embriones tratados con dexametasona mostraron una reducción significativa del tamaño del hígado en comparación con los embriones de control. Barra de escala = 1 milímetro (mm); ojos (E); intestino (G); cola (T).

La figura 13 es una ilustración gráfica que muestra una respuesta a la dosis de los embriones de pez cebra a diferentes dosis de dexametasona. Los embriones de pez cebra fueron expuestos a diferentes concentraciones de dexametasona (es decir, concentraciones que van de 1 μM a 100 μM) durante cinco días tal como se describe en las figuras 12A y 12B. Después del tratamiento, los embriones fueron teñidos con un tinte soluble para detectar defectos en el hígado específicamente. Después de la tinción, el producto formado por la peroxidasa se detectó por absorbancia a 405 nanómetros (nm). Los valores se expresaron como porcentaje de control (% de control), donde el control (es decir, los embriones no tratados) es del 100%. La desviación estándar también se calculó y se añadió a los datos. La toxicidad en el hígado como resultado de la dexametasona es sugerida por una reducción del tamaño del hígado.

La figura 14 es una fotografía de un embrión de pez cebra de seis días de edad fijado con paraformaldehído y teñido con fosfatasa alcalina. La flecha indica la posición del riñón del embrión teñido. Barra de escala = 1 mm; ojos (E); intestino (G); cola (T).

DEFINICIONES

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por los expertos en la materia a la que pertenece esta invención. Las siguientes referencias proporcionan a un experto con una definición general de muchos de los términos utilizados en esta invención: Singleton et al, Diccionario de microbiología y biología molecular (2ª edición, 1994); DICCIONARIO CAMBRIDGE DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (Walker ed., 1988) y Hale y Marham, DICCIONARIO HARPER COLLINS DE BIOLOGÍA (1991). Tal como se usa aquí, los siguientes términos y frases tendrán el significado que se les atribuye a menos que se especifique lo contrario. Aunque los procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos aquí pueden ser utilizados en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen los procedimientos y materiales preferidos. Para los efectos de la presente invención, los siguientes términos y frases están pensados para que tengan el siguiente significado general tal como se utilizan en este documento:

El término "sujeto", tal como se usa aquí, incluye un animal. El término "animal" tal como se usa aquí incluye los animales vertebrados, tales como peces vertebrados. Los peces vertebrados son teleósteos, tales como, *por ejemplo*, el pez cebra, medaka, rerio gigante y pez globo.

El término "teleósteos" tal como se usa aquí significa de o perteneciente a los Telostei o Teleostomi, un grupo formado por numerosos peces que tienen esqueletos óseos y aletas rayadas. Los teleósteos incluyen, *por ejemplo*, el pez cebra, medaka, rerio gigante y pez globo.

El término "larva" o "larval", tal como se usa aquí, significa que el estado de cualquiera de varios animales, incluyendo animales vertebrados, tales como peces vertebrados (incluyendo peces teleósteos, tales como,

por ejemplo, el pez cebra, medaka, rerio gigante, y pez globo), entre embriogénesis y adultos.

[0019] "Actividad de la angiogénesis" o "actividad angiogénica", en referencia a un agente se define aquí como la capacidad del agente para mejorar, inhibir o prevenir la formación o la extensión de los vasos sanguíneos o los vasos linfáticos. La actividad de la angiogénesis o actividad angiogénica en referencia a un sujeto se refiere a las actividades asociadas con la angiogénesis en un sujeto u órgano(s) o tejido(s) de un sujeto o que se originan dentro de un sujeto u órgano(s) o tejidos(s) del sujeto.

[0020] "Actividad de la anti-angiogénesis" o "actividad anti-angiogénica", en referencia a un agente se define aquí como la capacidad del agente para inhibir, prevenir o reducir en gran medida la formación o la extensión de los vasos sanguíneos o linfáticos, o destruir estos vasos durante la germinación o extensión. La actividad de la anti-angiogénesis o actividad anti-angiogénica en referencia a un sujeto se refiere a la actividad asociada con la anti-angiogénesis en un sujeto u órgano(s) o tejido(s) de un sujeto o que se originan dentro de un sujeto u órgano(s) o tejidos(s) del sujeto.

[0021] El término "actividad apoptótica" o "actividad de la apoptosis", en referencia a un agente se define aquí como la capacidad del agente para mejorar, inhibir o prevenir la apoptosis. La actividad apoptótica o la actividad de la apoptosis en referencia a un sujeto se refiere a la actividad asociada con la muerte de las células dentro de un sujeto u órgano(s) o tejido(s) de un sujeto o que se generan dentro de un sujeto u órgano(s) o tejidos (s) del sujeto.

[0022] "Actividad de la muerte celular", en referencia a un agente se define aquí como la capacidad del agente para mejorar, inhibir o prevenir la muerte de una o más células en un sujeto u órgano(s) o tejido(s) de un sujeto o que se generan dentro de un sujeto u órgano(s) o tejidos(s) del sujeto. La actividad de la muerte celular en referencia a un sujeto se refiere a la actividad asociada con la muerte de las células dentro de un sujeto u órgano(s) o tejido(s) de un sujeto o que se generan dentro de un sujeto u órgano(s) o tejidos(s) del sujeto.

[0023] El término "actividad necrótica" o "actividad de la necrosis", en referencia a un agente se define aquí como la capacidad del agente para mejorar, inhibir o prevenir la necrosis.

[0024] Un "efecto sobre la actividad de la muerte celular", como se usa aquí, se refiere a la forma en que un agente actúa sobre o influye en la actividad de muerte celular en un sujeto. Estos efectos incluyen la capacidad de aumentar o inhibir la actividad de la muerte celular en el sujeto, como se indica o se manifiesta mediante, por ejemplo, una manifestación clínica, característica, síntoma, o evento que se produce o se observa, asociados con, o propio de la muerte de las células en un sujeto.

[0025] Un "efecto sobre la actividad apoptótica", como se usa aquí se refiere a la forma en que un agente actúa sobre o influye en la actividad apoptótica en un sujeto. Estos efectos incluyen la capacidad de aumentar o inhibir la actividad de la apoptosis en el sujeto, como se indica o se manifiesta mediante, por ejemplo, una manifestación clínica, característica, síntoma, o evento que se produce o se observa, asociado, o propio de la apoptosis de las células en un sujeto.

[0026] Un "que se produce de manera endógena", como se usa aquí, significa que se produce originándose desde dentro.

[0027] El término "gen" se utiliza ampliamente para referirse a cualquier segmento de ADN asociado con una función biológica. Así, los genes son secuencias de codificación y/o las secuencias reguladoras necesarias para su expresión. Los genes también incluyen segmentos de ADN no expresados que, por ejemplo, forman secuencias de reconocimiento para otras proteínas. El término "ácido nucleico" o "segmento de ácido nucleico" se refiere a un desoxirribonucleótido o ribonucleótido y a un polímero de los mismos que es en forma de una sola o de doble cadena. A menos que se limite específicamente, el término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos (sintéticos y naturales) de los nucleótidos, que tienen similares propiedades de unión como el ácido nucleico de referencia y se metabolizan en forma similar a los nucleótidos de referencia. A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico particular abarca también implícitamente variantes modificadas de manera conservadora de los mismos (por ejemplo, sustituciones de codón degeneradas) y secuencias complementarias, así como la secuencia que se indica explícitamente. En concreto, se pueden lograr sustituciones de codón degeneradas mediante la generación de secuencias en las que la tercera posición de uno o más (o todos) de los codones seleccionados es sustituida con residuos de base mixta y/o deoxiinosina (Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al, J. Biol Chem 260:2605-2608 (1985), Rossolini et al, Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)). El término ácido nucleico se utiliza indistintamente con gen, ADNc, y ARNm codificado por un gen.

[0028] El término "ácido nucleico aislado" o "segmento de ácido nucleico aislado" se refiere a un ácido nucleico de una o de doble cadena (por ejemplo, un ARN, ADN, o un polímero mezclado), que está sustancialmente separado de otras secuencias de ADN del genoma, así como proteínas o complejos tales como ribosomas y polimerasas, que naturalmente acompañan a una secuencia nativa. El término abarca una secuencia de ácido nucleico que se ha eliminado de su entorno natural, e incluye aislamientos de ADN recombinante o clonado y análogos químicamente sintetizados o biológicamente análogos mediante sistemas heterólogos. Una molécula sustancialmente pura incluye formas aisladas de la molécula. Un "polipéptido aislado" o proteína tiene un significado similar con el polipéptido o la proteína sustancialmente separados de cualquier contaminante celular y componentes naturalmente

asociados a la proteína *in vivo*.

- 5 **[0029]** Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en este documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a los polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos es un análogo químico artificial de un aminoácido natural correspondiente, así como a los polímeros de aminoácidos que se producen de forma natural.
- [0030]** Los aminoácidos pueden referirse aquí por sus bien conocidos símbolos de tres letras o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB. Los nucleótidos, del mismo modo, pueden referirse a sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados.
- 10 **[0031]** Una "molécula quimérica", como se usa aquí, se refiere a una molécula unida obtenida después de la conjugación de dos o más tipos diferentes de moléculas (*por ejemplo*, lípidos, glicolípidos, péptidos, proteínas, glucoproteínas, hidratos de carbono, ácidos nucleicos, productos naturales, compuestos sintéticos, molécula orgánica, molécula inorgánica, etc.).
- [0032]** El término "formación normal de los vasos sanguíneos", como se usa aquí se refiere al proceso típico, normal, o natural de la formación o la producción de vasos sanguíneos en un sujeto.
- 15 **[0033]** El término "perfil de expresión génica" o "patrón de expresión génica", como se usa aquí, significa un perfil o patrón basado en la detección de ARNm de cada gen que se incluirá en el perfil o patrón. El ARNm se puede detectar en un momento determinado o en una condición determinada. El ARNm se extrae de las células, tejidos, órganos, o de todo un organismo de interés y se detecta. La cantidad o el nivel de ARNm de un gen en particular se pueden determinar cuantitativamente.
- 20 **[0034]** El término "perfil de expresión de la proteína" o "patrón de expresión de la proteína", como se usa aquí, significa un perfil o patrón basado en la detección de una proteína. La proteína puede ser detectada en un momento determinado o en una condición determinada. Las proteínas son extraídas de las células, tejidos, órganos, o todo un organismo de interés y se detecta. La cantidad o el nivel de proteína se pueden determinar cuantitativamente.
- 25 **[0035]** El término "agente" comprende cualquier elemento, compuesto o entidad, incluyendo pero no limitado a, *por ejemplo*, farmacéuticos, terapéuticos, farmacológicos, contaminantes ambientales o agrícolas o compuesto, contaminantes acuáticos, cosméticos, medicamentos, toxinas, productos naturales, compuestos sintéticos o compuestos químicos.
- 30 **[0036]** El término "compuesto natural", como se usa aquí, incluye una molécula aislada, extraída, o purificada de una planta, animal, hongos, bacterias, o de otros microorganismos. Un compuesto natural incluye, *por ejemplo*, entre otras cosas, las moléculas orgánicas pertenecientes a las clases generales bioquímicas de péptidos, proteínas, glicoproteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos, grasas, glicolípidos, así como moléculas más complejas que comprenden, *por ejemplo*, elementos de más de una de estas clases de bioquímica básica.
- [0037]** El término "compuesto sintético" como se usa aquí incluye una molécula sintetizada *de novo* o producida mediante la modificación o derivación de un compuesto natural.
- 35 **[0038]** "Defecto de desarrollo" como se usa aquí, significa una deficiencia, imperfección, o diferencia en el desarrollo de un tejido, órgano, o de otros componentes corporales de un animal en relación con el desarrollo normal. Tal defecto se identifica como un cambio, diferencia, o falta de algo necesario o conveniente para la terminación o el correcto funcionamiento en el desarrollo de un tejido, órgano, u otro componente corporal de los animales en comparación con el desarrollo normal de los componentes. Los defectos en el desarrollo incluyen, por ejemplo, el fallo del órgano para desarrollarse correctamente, la proliferación celular excesiva o reducida en comparación con la proliferación celular normal, y el mal funcionamiento de un órgano o tejido.
- 40 **[0039]** Por lo general, la nomenclatura utilizada a partir de ahora y los procedimientos de laboratorio de cultivo celular, genética molecular y química de ácidos nucleicos que se describen a continuación son los bien conocidos y comúnmente empleados en la técnica. Técnicas estándar como se describen en Sambrook et al, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2ª ed 1989) y CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vols. 1-3 (Virginia Benson Chanda ed., John Wiley & Sons, 1994-1998), se utilizan para los procedimientos de ácidos nucleicos recombinantes, síntesis de ácidos nucleicos, cultivo celular, y la incorporación de transgén, *por ejemplo*, electroporación, inyección, ingestión, y lipofección. Las técnicas de electroporación utilizan un pulso de alta corriente eléctrica para introducir moléculas de interés en las células, tejidos u organismos. La lipofección emplea moléculas catiónicas a modo de lípidos que interactúan fuertemente con las membranas celulares, desestabilizándolas de forma local, permitiendo así que el ADN y el ARN entre en las células. En general, las etapas de síntesis y purificación de oligonucleótidos se realizaron de acuerdo a las especificaciones. Las técnicas y procedimientos se realizan generalmente de acuerdo con los procedimientos convencionales en la técnica y varias referencias generales que se proporcionan en este documento. Los procedimientos aquí se creen que son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para la conveniencia del lector.
- 55 **[0040]** El término "transgénico", en referencia a un organismo o animal incluye aquellos organismos o

animales que se han desarrollado a partir de un óvulo fertilizado, en un cromosoma de que se ha insertado un gen extraño. Tales organismos y animales transgénicos llevan la inserción del gen extranjero en todas las células. Los organismos y los animales transgénicos son creados mediante el uso de técnicas conocidas (*véase, por ejemplo*, Sambrook, *supra* y BIOCHEMISTRY WITH CLINICAL CORRELATIONS (ed. T. Devlin, 3ª ed. 1992). Los organismos y los animales transgénicos pueden ser utilizados para estudiar los diferentes aspectos de los genes extranjeros, incluyendo el análisis de elementos reguladores de ADN, expresión de las proteínas durante la diferenciación de la especificidad tisular, y el papel potencial de los productos de oncogenes en el crecimiento, la diferenciación y la inducción de la tumorigénesis. Un "transgen" es un gen, en forma original o modificada, que ha sido introducido en un organismo o animal que no tiene naturalmente dicho gen. Un "transgen que se expresa con mosaicos" es un transgen que se expresa al azar en un subconjunto de células del organismo o animal transgénico. Un "gen exógeno" es un gen de un organismo o animal que no pertenece a la especie en la que el gen ha sido introducido. Un "animal transgénico transitorio" es un animal transgénico que lleva un gen introducido que no se inserta en un cromosoma.

[0041] El término "pez fundador" como se usa aquí se refiere al pez a partir del cual se genera una línea de peces. Por lo general, un pez fundador es un pez que lleva una mutación única y que se utiliza para generar prole que también llevan la mutación.

[0042] Una "actividad fisiológica", en referencia a un organismo, se define aquí como cualquier proceso, funciones o actividades normales de un organismo vivo.

[0043] Una "actividad profiláctica" es una actividad de, por ejemplo, un agente, gen, segmento de ácido nucleico, sustancia farmacéutica, compuesto o composición que, cuando se administra a un sujeto que no presenta signos o síntomas de una enfermedad o muestra sólo los primeros signos o síntomas de una enfermedad, disminuye, decrece o evita el riesgo en el sujeto del desarrollo de la patología.

[0044] Una "actividad terapéutica" se define aquí como cualquier otra actividad de *por ejemplo*, un agente, gen, segmento de ácido nucleico, sustancia farmacéutica, terapéutica, sustancia, compuesto o composición, que disminuye o elimina los signos o síntomas patológicos si se administra a sujetos que presentan la patología. El término "terapéuticamente útil", en referencia a un agente, significa que el agente es útil en la disminución, decrecimiento, tratamiento o eliminación de signos o síntomas patológicos de una patología o enfermedad.

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES ESPECÍFICAS

I. GENERAL

[0045] La presente invención se refiere a procedimientos de cribado de un agente para una actividad. En la Sección II de la solicitud, se describen procedimientos de cribado de un agente para una habilidad o capacidad para mejorar, inhibir o bloquear la actividad de la angiogénesis. En la sección III, se describen procedimientos de selección de un agente para la capacidad de mejorar, inhibir, o causar actividad de la muerte de las células. En la Parte IV, se presentan procedimientos de cribado de un agente para una actividad tóxica.

A. Modelos Animales

[0046] Los procedimientos de la presente invención, que están dirigidas al cribado de agentes para actividades (*por ejemplo*, actividad de la angiogénesis, actividad de la muerte celular, y actividad tóxica), son generalmente aplicables para su uso en varios animales, incluyendo animales vertebrados, tales como peces. Varias especies de peces son adecuadas, incluyendo peces teleósteos. Teleósteos adecuados incluyen, por ejemplo, pez cebra (*Danio rerio*), medaka, rerio gigante y pez globo. Típicamente, los modelos animales de la presente invención son peces que son transparentes o translúcidos (*es decir*, ópticamente transparentes) en al menos una de las siguientes etapas: la etapa embrionaria, larval o adulta.

[0047] Ciertos teleósteos, incluyendo el pez cebra, medaka, rerio gigante y el pez globo, ofrecen importantes ventajas sobre otros sistemas de modelos de animales para su uso en los procedimientos de cribado de la presente invención. En primer lugar, estos teleósteos son vertebrados cuya composición genética está más estrechamente relacionada con la del hombre que otros modelos, como la *Drosophila* y el nematodo. Todos los componentes esenciales de la forma humana y el desarrollo de órganos son imitados en estos teleósteos y las bases morfológicas y moleculares de los tejidos y el desarrollo de los órganos son idénticos o similares a los de otros vertebrados, incluido el hombre. Chen y Fishman, Development 123:293-302 (1996); Granato y Nusselien Volhard, Cur. Op. Gen. Dev. 6:461-468 (Wylie ed. 1996). Como resultado, estos teleósteos sirven como un excelente modelo para el estudio de desarrollo de los vertebrados y los estados de enfermedades humanas.

[0048] En segundo lugar, estos teleósteos proporcionan modelos de animales ventajosos porque sus embriones son transparentes. Dada la transparencia del embrión, la actividad de la angiogénesis, la actividad de la muerte celular (*por ejemplo*, apoptosis y necrosis), y la actividad tóxica producida por los medicamentos administrados pueden ser detectadas y diagnosticadas mucho más rápidamente que en animales no transparentes. Estas actividades también pueden ser detectadas en la forma larval más madura y la forma adulta del pez cebra, aunque algo menos fácilmente, ya que estas formas son cada vez menos ópticamente transparente. Estas actividades también pueden ser detectadas *in vivo* en las tres formas o en las células de las mismas *in vitro*. Por el contrario, el ratón, que se usa

comúnmente como un sistema de modelo animal, es un animal opaco y no permite una rápida evaluación similar o *in vivo* de los cambios fenotípicos o de desarrollo, incluidos los relacionados con la muerte celular, la angiogénesis, o la toxicidad, en el animal entero u órganos enteros o tejidos. Significativamente, los tejidos precursores y los componentes del cerebro, ojos, corazón y musculatura de los peces teleósteos se detectan y visualizan con mayor facilidad y rapidez en los teleósteos transparentes que en otros sistemas, incluyendo sistemas de otros vertebrados (como el ratón) mediante una variedad de técnicas de detección, incluyendo, *por ejemplo*, microscopía óptica, microscopía de fluorescencia, colorimetría, quimioluminiscencia, imágenes digitales, técnicas de lector de microplacas, hibridación de ARN *in situ*, etc.

[0049] Otra ventaja importante de los teleósteos sobre otros modelos animales es que los teleósteos se desarrollan mucho más rápidamente que los otros modelos animales. En general, el plan del cuerpo, órganos, tejidos y otros sistemas de teleósteos se desarrollan mucho más rápidamente que los componentes de este tipo en otros sistemas de modelo de vertebrados (*por ejemplo*, el ratón). El plan del cuerpo vertebrado completo del pez cebra, por ejemplo, se establece normalmente en 24 horas. Un sistema de funcionamiento cardiovascular es evidente en el pez cebra en las primeras 24 horas de desarrollo. Stainier y Fishman, Trends Cardiovasc. Med. 4:207-212 (1994). El resto de órganos del pez cebra, incluyendo los intestinos, hígado, riñón y vasos, se establecen en un plazo de 48 horas. El embrión del pez cebra rayado casi completa la morfogénesis durante 120 horas, con lo que lo hace muy accesible a la manipulación y la observación y es susceptible de un alto rendimiento de observación automatizada y procedimientos de detección.

[0050] La actividad de la actividad de la muerte celular, la actividad de la angiogénesis, y la actividad tóxica de un agente y las respuestas que indican estas actividades pueden ser monitoreadas en los teleósteos completos y/o *in vivo* o en las células de los mismos *in vitro* a lo largo del tiempo - un procedimiento que no es posible o practicado con facilidad con otros embriones de animales que se desarrollan *in utero*, como el ratón. Además, los efectos de un agente en el embrión del teleósteo completo o en más de un sistema (*por ejemplo*, sistema cardiovascular, sistema intestinal, y sistema de la musculatura), órgano o tejido se pueden detectar de forma simultánea con los teleósteos transparentes. La persistencia de estos efectos puede ser controlada mediante el uso de procedimientos simples de visualización y a lo largo de intervalos de tiempo seleccionados. En comparación, es extremadamente difícil de detectar y evaluar los cambios fenotípicos y de desarrollo en órganos, tejidos y sistemas (tales como la inhibición o la mejora de la actividad de la angiogénesis, la muerte celular o actividad tóxica debido a un agente) a lo largo del tiempo en animales que se desarrollan *in utero*. Los embriones de ratón, por ejemplo, deben ser retirados de la madre - un procedimiento con un trabajo intensivo - antes de que se pueda realizar un ensayo.

[0051] Los teleósteos también ofrecen la ventaja de que pueden ser administrados agentes para evaluar los efectos tóxicos directamente en el teleósteo en desarrollo. La introducción directa de los compuestos candidatos se ve obstaculizada en los animales que se desarrollan *in utero*, tal como el embrión de ratón. Además, el embrión de teleósteo es un organismo autosuficiente intacto. Es diferente de un embrión de ratón, por ejemplo, que debido a que se ha retirado físicamente del vientre de su madre, no es autosuficiente o intacto; un embrión de ratón funcionaría más como un cultivo de un "órgano" o similares.

[0052] Otra ventaja importante es el coste. Los ensayos de ratón son caros, principalmente debido al costo de la cría y el mantenimiento y la necesidad de realizar manualmente las inyecciones y los análisis posteriores. El coste medio de un ensayo de tumores con ratones comercial es de aproximadamente 2.900 dólares (1.600 dólares para el gobierno). Por el contrario, los teleósteos, tales como el pez cebra, son relativamente baratos de generar y mantener. Por ejemplo, el coste estimado de un ensayo en pez cebra es menor de 100 dólares. Un solo apareamiento de un pez cebra produce 100-200 huevos. Cepas puras están disponibles y miles de peces cebra se pueden generar económicamente en una pequeña sala de acuario. Además, los huevos de teleósteos, incluyendo los del pez cebra, son fecundados externamente. Los embriones de teleósteos (tal como el pez cebra) pueden sobrevivir por difusión del oxígeno del agua y los nutrientes del vitelo y por lo tanto, incluso la ausencia de todo el sistema circulatorio es bien tolerada durante el desarrollo temprano. Weinstein et al., Nature Med. 1:1143-1147 (1995).

[0053] Además, sólo los embriones de teleósteos completos se pueden mantener *in vivo* en volúmenes de fluidos tan pequeños como 100 microlitros para los primeros seis días de desarrollo. Los embriones vivos intactos pueden mantenerse en cultivo en pocillos de microtitulación individuales o placas múltiples pocillos. Los compuestos de prueba se pueden añadir directamente a la solución en la que está inmerso el pez. Los compuestos penetran en el embrión intacto directamente, haciendo este formato de múltiples pocillos particularmente atractivo para el cribado de alto rendimiento y de compuestos automatizado. Tanto las actividades terapéuticas como los efectos secundarios (*por ejemplo*, toxicidad) de un fármaco se pueden probar en los peces de forma simultánea *in vivo*.

[0054] Los teleósteos utilizados con los procedimientos de cribado de la invención son típicamente embriones de teleósteos en las primeras etapas; sin embargo, teleósteos larvales o adultos transparentes también se pueden utilizar. Las cepas de tipo salvaje de los teleósteos se emplean usualmente. Las cepas de tipo salvaje normalmente se mantienen alrededor de un año, después del cual la fertilidad disminuye con el tiempo. Las cepas mutantes de los teleósteos (como el pez cebra) se pueden utilizar para evaluar, *por ejemplo*, la interacción entre los agentes terapéuticos y deficiencias genéticas específicas. Los teleósteos pueden contener una mutación en un gen seleccionado. La mutación puede ser una mutación hereditaria, incluyendo, *por ejemplo*, una mutación hereditaria asociada a un defecto de desarrollo. Los teleósteos también pueden ser transgénicos.

B. Agentes que se cribarán

[0055] Una variedad de agentes de varias fuentes pueden ser cribados para aumentar o inhibir la actividad de la angiogénesis, la actividad de la muerte celular, y/o la actividad tóxica mediante el uso de los procedimientos de la presente invención. Los agentes que se cribarán pueden ser de origen natural o moléculas sintéticas. Los agentes que se cribarán también pueden obtenerse de fuentes naturales, tales como, *por ejemplo*, microorganismos marinos, algas, plantas, hongos, etc. Alternativamente, el agente que se cribará puede ser de librerías combinatorias de agentes, incluyendo péptidos o moléculas pequeñas, o de repertorios existentes de compuestos químicos sintetizados en la industria, *por ejemplo*, por la industria química, farmacéutica, medioambiental, agrícola, marina, fármacos, cosmética, e industrias biotecnológicas. Los agentes pueden incluir, *por ejemplo*, productos farmacéuticos, terapéuticos, medioambientales, agrícolas o industriales, contaminantes, cosmeceúticos, fármacos, compuestos orgánicos, lípidos, glucocorticoides, antibióticos, péptidos, proteínas, azúcares, hidratos de carbono, moléculas quiméricas, etc.

[0056] Las librerías combinatorias se pueden producir para muchos tipos de compuestos que se pueden sintetizar en una manera paso a paso. Tales compuestos incluyen polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, miméticos de giro beta, polisacáridos, fosfolípidos, hormonas, prostaglandinas, esteroides, compuestos aromáticos, compuestos heterocíclicos, benzodiazepinas, glicinas N-sustituidas oligoméricas y oligocarbamatos. Grandes librerías combinatorias de compuestos pueden ser construidas mediante el procedimiento de librerías sintéticas de codificadas (ESL) descrito en Affymax, WO 95/12608, Affymax WO 93/06121, Universidad de Columbia, WO 94/08051, Farmacopea, WO 95/35503 y Scripps, WO 95/30642. Librerías de péptidos también pueden ser generadas mediante procedimientos de visualización de fagos. Véase, *por ejemplo*, Devlin, WO 91/18980. Los compuestos que se cribarán también pueden ser obtenidos de fuentes gubernamentales o privadas, incluidas, *por ejemplo*, el Depósito de Productos Naturales del Instituto Nacional del Cáncer (NCI), Bethesda, MD, la Colección de Compuestos Sintéticos Abiertos del NCI, Bethesda, MD, Programa Terapéutico de Desarrollo del NCI, o similares.

C. Administración de agentes

[0057] Los agentes que se cribarán para un efecto sobre la actividad de la angiogénesis, la actividad de la muerte celular, y/o la actividad tóxica pueden ser administrados a los teleósteos mediante la adición del agente directamente al medio que contiene los teleósteos vivos. Alternativamente, el agente puede ser disuelto primero en el medio y los teleósteos vivos sumergirse en el medio posteriormente. Estos enfoques se han utilizado para introducir anestésicos y otros productos químicos a los embriones de los peces. Véase, *por ejemplo*, M. Westerfield, THE ZEBRAFISH BOOK: A GUIDE FOR THE LABORATORY USE OF ZEBRAFISH (3a. ed 1995). Los agentes también se pueden administrar a los teleósteos mediante el uso de técnicas de microinyección en las que se inyecta el agente directamente en el teleósteo vivo. Por ejemplo, los agentes pueden ser inyectados en el vitelo o en el cuerpo de un embrión de teleósteo o ambos.

[0058] Los agentes también se pueden administrar a los teleósteos mediante electroporación, lipofección, o ingestión o mediante el uso de tecnología de carga celular biolística en la que partículas recubiertas con la molécula biológica son inyectadas de manera "biolística" en la célula o tejido de interés con una pistola de alta presión. Estas técnicas son bien conocidas por los expertos en la materia. Véase, *por ejemplo*, Sambrook *et al, supra*; Chow *et al*, Amer.. J. Pathol. 2 (6) :1667-1679 (1998).

[0059] Los agentes pueden ser administrados solos, en combinación con una variedad de disolventes (*por ejemplo*, dimetilsulfóxido o similares) o portadores (incluyendo, *por ejemplo*, péptidos, portadores de lípidos o solventes), o en combinación con otros compuestos.

[0060] Los agentes pueden ser administrados a los teleósteos antes, al mismo tiempo, o después de la administración de un tinte para la detección de la respuesta en el animal indicando una actividad específica (*por ejemplo*, actividad de muerte celular, actividad de la angiogénesis, actividad tóxica).

D. Administración de los tintes

[0061] Un tinte utilizado en procedimientos de cribado de agentes para una actividad (*por ejemplo*, actividad de muerte celular, actividad de la angiogénesis, actividad tóxica) puede ser administrado a los teleósteos mediante la adición del agente directamente al medio que contiene los teleósteos vivos. Alternativamente, el primer tinte puede ser disuelto en el medio y el teleósteo vivo sumergido en el medio posteriormente. Véase, *por ejemplo*, Westerfield, *supra*. Los tintes también se pueden administrar a los teleósteos mediante el uso de técnicas de microinyección en las que se inyecta el tinte directamente en los teleósteos vivos. Los tintes pueden ser inyectados en el vitelo o el cuerpo de un embrión de teleósteo o ambos.

[0062] Los tintes se pueden administrar en solitario, en combinación con una variedad de disolventes (*por ejemplo*, dimetilsulfóxido o similares), o en combinación con otros tintes. Los tintes pueden ser administrados al teleósteo antes, al mismo tiempo, o después de la administración de un tinte para la detección de la respuesta en el teleósteo que indique una actividad específica (*por ejemplo*, actividad de muerte celular, actividad de la angiogénesis, actividad tóxica). Cuando se utilizan tintes fluorescentes (*por ejemplo*, tintes de cianina asimétrica, tal como un tinte de quinolina) para la detección de una actividad (*por ejemplo*, actividad de muerte celular), el tinte se administra preferiblemente antes de la administración del agente.

E. Actividad de los agentes de detección y respuestas en teleósteos

[0063] Una variedad de técnicas se pueden utilizar juntas o por separado para generar una señal y para detectar y evaluar el efecto de un agente en la actividad de muerte celular o actividad de la angiogénesis o actividad tóxica de un agente. Las señales se pueden generar mediante, por ejemplo, hibridación *in situ*, tinción de anticuerpos de proteínas específicas (*por ejemplo*, marcadores de anticuerpos que etiquetan las proteínas de señalización implicadas en la formación de vasos angiogénicos en teleósteos, incluyendo VEGF y Ang1 y 2; el etiquetado terminal de nucleótidos de desoxiuridina para detectar células muertas o moribundas, etc.). Las respuestas que indican la actividad tóxica o angiogénica o un efecto de la actividad de muerte celular pueden ser detectadas mediante, *por ejemplo*, inspección visual, colorimetría, microscopía de fluorescencia, microscopía de luz, quimioluminiscencia, análisis de imagen digital, técnicas estándar de lector de microplacas, fluorometría, incluyendo fluorometría resulta con el tiempo, inspección visual, cámaras CCD, cámaras de vídeo, película fotográfica, o el uso de instrumentos actuales, tal como dispositivos de escaneado láser, fluorómetros, fotodiodos, contadores cuánticos, lectores de placas, microscopios de epifluorescencia, microscopio de escaneado, microscopios confocales, citómetros de flujo, detectores de electroforesis capilar, o medios de amplificación de la señal, tal como un tubo fotomultiplicador, etc. Las respuestas pueden ser objeto de discriminación y/o análisis mediante el uso de software de reconocimiento de patrones. Los agentes se identificaron y seleccionaron utilizando los procedimientos de selección de acuerdo a las actividades y las respuestas que producen.

[0064] Los cambios en la distribución de una proteína, tanto espacial como temporalmente, incluyendo una completa ausencia de una proteína, se pueden detectar y se pueden generar perfiles de expresión de la proteína. Los cambios en el nivel de una enzima o la actividad enzimática en el teleósteo intacto también pueden ser detectados por varios medios, incluyendo, *por ejemplo*, tinción de fosfatasa alcalina y uso de enzima reportera conjugada de estreptavidina (avidina) para detectar enzimas de carboxilasa biotiniladas naturalmente en el hígado, el intestino, y el tubo digestivo de los animales.

F. Procedimientos automatizados

[0065] Además de los procedimientos de cribado manual, la presente invención también proporciona procedimientos para el cribado rápido de agentes para actividades, tal como la actividad de la actividad de la angiogénesis, la actividad de la muerte celular, y la actividad tóxica, usando procedimientos automatizados. Tales procedimientos automatizados pueden ser fácilmente realizados mediante el uso de instrumental automatizado disponible comercialmente y software y la observación conocida automatizada y procedimientos de detección. Formatos de múltiples pocillos son particularmente atractivos para el cribado de alto rendimiento de procesamiento complejo y automatizado. Los procedimientos de detección se pueden realizar, por ejemplo, usando un formato de pocillos de microplaca estándar, con un embrión de pez cebra completo en cada pocillo de la microplaca. Este formato permite que los ensayos de cribado se automaticen utilizando procedimientos estándar de microplacas y lectores de microplacas para detectar la mejora o la inhibición de la actividad de la angiogénesis en los embriones de pez cebra en los pocillos. Un lector de microplacas incluye cualquier dispositivo que es capaz de leer una señal de una microplaca (*por ejemplo*, una placa de 96 pocillos), incluyendo fluorometría (estándar o resuelta en el tiempo), luminometría, o fotometría en cualquier punto final o ensayos cinéticos. Usando estas técnicas, el efecto de un agente específico en un gran número de peces teleósteos (*por ejemplo*, embriones de teleósteos) *in vivo* o *in vitro* se pueden determinar rápidamente. Además, con dicha disposición, una amplia variedad de agentes pueden ser rápida y eficientemente cribados de sus respectivos efectos en las células de los teleósteos contenidos en los pocillos.

[0066] Procedimientos de manipulación y detección de las muestras se pueden automatizar mediante la instrumentación disponible en el mercado y los sistemas de software para la aplicación rápida reproducible de tintes y agentes, cambio del fluido, y detección automática de los compuestos de interés. Para aumentar el rendimiento de una administración de compuestos, se pueden utilizar sistemas robóticos disponibles en la actualidad (*por ejemplo*, el BioRobot 9600 de Qiagen, el Zymate de Zymark o el Biomek de Beckman Instruments) - la mayoría de las cuales utilizan el formato de placa de cultivo de múltiples pocillos -. El procedimiento de procesamiento implica un gran número de cambios en el fluido que se deben realizar en los puntos de tiempo definidos. El rendimiento no automatizado es típicamente de 5 placas de microtitulación por investigador (400 embriones de teleósteos y 20 compuestos) por semana, basado en el uso de una placa de 96 pocillos con un embrión por pocillo y cribado de 2 concentraciones con 10 embriones por concentración. Usando el hardware de manipulación de fluidos disponibles en la actualidad (*por ejemplo*, Bodhan Automation, Inc., Zymark) y nuestros procedimientos estándar de manipulación de muestras, se pueden procesar 50-100 placas por día (4.800-9.600 embriones de teleósteos y 200 a 400 compuestos). La incorporación de instrumentos de manipulación de fluidos disponibles en el mercado reduce significativamente el marco de tiempo de los procedimientos de cribado manual y permite el análisis eficiente de muchos agentes, incluidas las librerías de agentes.

II. PROCEDIMIENTOS DE CRIBADO DE UN AGENTE PARA UN EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ANGIOGÉNESIS

A. Angiogénesis

[0067] La formación y el establecimiento de un suministro vascular es un requisito esencial para el flujo de entrada celular de nutrientes, el flujo de salida de los productos de desecho, y el intercambio de gases en la mayoría de tejidos y órganos. Dos procesos para este desarrollo y la diferenciación de los vasos sanguíneos han sido identificados.

Un proceso de vascularización, denominado "vasculogénesis", se produce en el embrión y consiste en la diferenciación *in situ* de células mesenquimales en hemoangioblastos. Los hemoangioblastos son los precursores de las células endoteliales y las células sanguíneas. El segundo proceso, llamado "angiogénesis", implica la formación de nueva sangre y vasos linfáticos a partir de endotelio preexistente. En este proceso, los tejidos y órganos son vascularizados por la brotación en la que los vasos más pequeños se extienden a partir de los vasos más grandes y penetran en un tejido específico. Fouquet *et al.*, *supra*. La angiogénesis también implica la migración y la proliferación de células endoteliales, su diferenciación en una estructura a modo de tubo, y la producción de una matriz de membrana basal alrededor del vaso. Herbert *et al.*, L. Cell. Biol. 106:1365-1373 (1988).

[0068] Los procedimientos para el cribado de agentes para la inhibición o la mejora de la actividad de la angiogénesis son útiles en la identificación de los agentes que podrían ser efectivos en el tratamiento terapéutico o profiláctico de una variedad de enfermedades que implican los procesos angiogénicos.

B. Formación de vasos sanguíneos

[0069] Nuevos vasos sanguíneos se forman durante el crecimiento normal del tejido y la reparación en una serie de pasos secuenciales: se activa una célula endotelial que forma la pared de un pequeño vaso sanguíneo (capilares) existente, segrega enzimas que degradan el tejido de la matriz extracelular (el entorno), invade la matriz, y comienza a dividirse. Con el tiempo, las cadenas de las nuevas células endoteliales se organizan en tubos huecos, creando nuevas redes de vasos sanguíneos que hacen posible el tejido y la reparación. Normalmente, las células endoteliales permanecen en estado latente. Sin embargo, cuando es necesario, cortas erupciones de crecimiento de los vasos sanguíneos se producen en partes localizadas de los tejidos. El nuevo crecimiento capilar está estrechamente controlado por un equilibrio afinado entre los factores que activan o inhiben el crecimiento de las células endoteliales. Alrededor de 15 proteínas se sabe que activan el crecimiento de las células endoteliales y el movimiento, incluyendo angiopoyetinas, factor de crecimiento epidérmico, estrógeno, factores de crecimiento de fibroblastos, prostaglandinas, factor de necrosis tumoral, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor estimulante de granulocitos (Zetter, Ann. Ap. Med. 49:407-424 (1998)). El VEGF se une a los receptores de la tirosina quinasa *flt-1* y *flk-1/KDR* en las células endoteliales (Hanahan, Science 277 (5322):48-50 (1997)). Los efectos posteriores del VEGF incluyen la activación de las proteasas de la matriz y las glucuronidasas, el desprendimiento de las uniones de las células endoteliales y la proliferación y migración de las células endoteliales. Los efectos posteriores del factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) incluyen la estimulación mitogénica de las células endoteliales (Relou *et al.*, Tissue Cell 5:525-530 (1998)). Algunos de los inhibidores de la angiogénesis conocidos incluyen angiostatina, endostatina, interferones, interleuquina 1, interleuquina 12, ácido retinoico, e inhibidores tisulares de metaloproteína 1 y 2 (Zetter, *supra*).

C. Inhibición de la angiogénesis

[0070] Como la angiogénesis es esencial para el crecimiento de tumores sólidos, la inhibición de la angiogénesis es una estrategia para prevenir el crecimiento tumoral. Al bloquear el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos, se puede cortar el suministro a un tumor de oxígeno y nutrientes y, por tanto, el crecimiento de los tumores y la metástasis continuada puede ser detenido. Varias estrategias pueden usarse para el diseño de agentes antiangiogénicos, incluyendo: 1) bloqueo de los factores que estimulan la formación de vasos sanguíneos, 2) uso de inhibidores naturales de la angiogénesis, y 3) bloqueo de las moléculas que permiten la formación de nuevos vasos sanguíneos para invadir el tejido circundante, y 4) incapacitar que las células endoteliales se dividan nuevamente. En general, los tumores con mayor densidad de vasos sanguíneos son más propensos a sufrir metástasis y se correlacionan con pobres resultados clínicos. Además, el desprendimiento de la célula del tumor primario comienza sólo después de que el tumor tiene una amplia red de vasos sanguíneos. Además, la angiogénesis y la metástasis requiere metaloproteinasas de la matriz, enzimas que descomponen el tejido circundante y la matriz extracelular en los vasos sanguíneos y la invasión tumoral. Varias diferencias entre la terapia de quimioterapia estándar y de antiangiogénesis resultan del hecho de que los inhibidores angiogénicos diana dividen las células endoteliales en lugar de las células tumorales. Los medicamentos antiangiogénicos que no son susceptibles de causar supresión de médula ósea, síntomas gastrointestinales, o pérdida del cabello, características de los tratamientos de quimioterapia estándar. Además, como los fármacos antiangiogénicos pueden no matar necesariamente los tumores, sino que los mantienen bajo control por tiempo indefinido, el punto final de los primeros ensayos clínicos pueden ser diferentes a las terapias estándar. En lugar de mirar sólo para la respuesta tumoral, puede ser apropiado evaluar el aumento de la supervivencia y el tiempo o la progresión de la enfermedad.

[0071] La resistencia a los fármacos es un problema importante con los agentes de quimioterapia porque la mayoría de las células del cáncer son genéticamente inestables y, por lo tanto, propensas a las mutaciones. Como los medicamentos angiogénicos se dirigen a las células endoteliales normales, que no son genéticamente inestables no pueden desarrollar, la resistencia a los medicamentos. Hasta ahora, la resistencia no ha sido un problema importante en los estudios a largo plazo con animales o en ensayos clínicos de posibles candidatos de fármacos terapéuticos. La terapia antiangiogénica puede ser útil en combinación con la terapia dirigida directamente a las células tumorales. Como cada tratamiento está dirigido a diferentes dianas celulares, el tratamiento combinado debería más eficaz. Existe un creciente reconocimiento de que el cáncer puede convertirse en una enfermedad crónica. Si los tratamientos son a largo plazo, el perfil de toxicidad de los fármacos, que puede ser examinado fácilmente en el embrión del teleosteo transparente (*por ejemplo*, el pez cebra), se convertirá en un parámetro cada vez más importante para el cribado y la

evaluación de los fármacos.

D. Estimulación de la angiogénesis

[0072] Aunque el tejido isquémico en el corazón o las extremidades secreta VEGF y bFGF, que estimulan el crecimiento local de los vasos sanguíneos colaterales, la formación natural de los vasos colaterales que se alimentan en el tejido isquémico raramente es suficiente para el pleno restablecimiento del flujo sanguíneo en pacientes con enfermedades cardiovasculares. El crecimiento de nuevos vasos sanguíneos, inducido por agentes exógenos angiogénicos, puede restaurar el flujo sanguíneo a los tejidos isquémicos en pacientes con diversas enfermedades cardiovasculares. La terapia angiogénica estimulante también puede proporcionar un procedimiento mínimamente invasivo para mejorar la función circulatoria en la enfermedad arterial coronaria (EAC), insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad arterial periférica (PAD) y enfermedad venosa periférica (PVD). Las terapias estimulantes angiogénicas también pueden facilitar la aceptación del trasplante o la supervivencia. Las desventajas de estimuladores angiogénicos incluyen exacerbación de crecimiento de los tumores ocultos y la progresión de la retinopatía diabética. Un agente ideal para inducir el crecimiento angiogénico de las arterias colaterales alrededor de una placa aterosclerótica deben funcionar sólo en la localización o ser suministrado localmente en los tejidos isquémicos.

[0073] La terapia génica de la angiogénesis es una técnica experimental que se utiliza para engañar al corazón en el desempeño de su propia operación de derivación mediante el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos. El gen que codifica una proteína, como el VEGF, que estimula los nuevos vasos sanguíneos que brotan de los ya existentes se inyecta en el corazón del paciente y el cuerpo realiza su propia derivación coronaria. Estos nuevos vasos son menos propensos a nuevos sedimentos. En experimentos preliminares con conejos, las arterias de las patas del conejo han sido atadas y el gen VEGF se ha aplicado directamente sobre las células musculares lisas que recubren la arteria usando un catéter y un globo pequeño. En tres a 10 días, nuevos vasos sanguíneos se observaron que brotaban y encontraban su camino alrededor de la obstrucción. Rivard et al. *Circulation* 99 (1):111-120 (1999). En experimentos preliminares con humanos, el gen se ha inyectado directamente en el ventrículo izquierdo, la cámara de bombeo del corazón. Los resultados hasta la fecha a partir de estos estudios son prometedores. No ha habido efectos secundarios y el peor resultado hasta la fecha es que no ha habido ningún resultado. El surgimiento de nuevos vasos, si se produce, parece que se detiene después de cuatro a seis semanas. Losordo et al., *Circulation* 98 (25):2800-2804 (1998).

E. Angiogénesis en el pez cebra

[0074] En el pez cebra, como en otros vertebrados, los vasos sanguíneos se forman a partir de células precursoras (angioblastos) ampliamente distribuido en todo el mesodermo del embrión. Algunos angioblastos migran largas distancias, mientras que otros permanecen a nivel local para la formación de vasos (Fouquet *et al.*, *supra*). Los vasos mayores, incluyendo la aorta, la vena cava y vasos dirigidos a algunos órganos, se cree que se forman mediante la unión local de angioblastos en tubos (vasculogénesis). Ver la figura 1. Además de vasculogénesis, los vasos más pequeños se extienden desde los vasos más grandes para penetrar en un tejido específico (angiogénesis) (Fouquet *et al.*, *supra*). Los experimentos sugieren que ambos procesos de formación de vasos - vasculogénesis y angiogénesis - están impulsados por señales locales. Al tercer día de desarrollo, el pez cebra ha desarrollado un sistema vascular intacto que funciona, que incluye vasos mayores y brotes, que tiene un patrón consistente de posición de los vasos. Ver las figuras 2A y 3A. Debido a que el embrión del pez cebra puede sobrevivir y desarrollarse durante un mínimo de 4-5 días sin un sistema circulatorio, con el pez cebra transparente es posible estudiar los efectos de una variedad de agentes en todos los aspectos de la formación vascular en un animal intacto vivo.

F. Ventajas del uso de pez cebra en los ensayos de cribado para la angiogénesis

[0075] En la actualidad, una serie de ensayos se utilizan para estudiar el proceso de la angiogénesis en diversos modelos animales. Estos ensayos incluyen la preparación de una ventana transparente en la piel de un conejo o un ratón, la inyección de células tumorales o matriz de soporte en una región avascular, tal como la córnea, y la inducción de isquemia por constricción de los vasos sanguíneos existentes (Jain et al., *Nat. Med.* 11:1203-1208 (1997)). Aunque estos y otros enfoques generan una gran cantidad de información sobre el proceso de la angiogénesis, la manipulación de los tejidos necesarios para cada ensayo los hacen inadecuados para su uso como herramientas de evaluación. (Ensayos comparativos se describen en detalle a continuación.). Los teleósteos y el pez cebra en particular ofrecen ventajas significativas para los ensayos de cribado *in vivo* para la angiogénesis. Como se señaló anteriormente, el pez cebra es relativamente barato de generar y mantener, y los embriones pueden ser colocados en pozos de microtítulo individuales, haciendo posible el análisis automatizado con el equipo estándar de manipulación de líquidos.

[0076] Además, con los teleósteos, tales como el pez cebra, los efectos secundarios de un agente puede ser monitorizados y evaluados de forma simultánea junto con el efecto principal del agente. Esto proporciona una ventaja significativa en los procedimientos para el cribado de compuestos para la actividad de la angiogénesis. Cabe destacar que una de las dificultades asociadas con la identificación de compuestos que pueden ser utilizados como agentes antiangiogénicos, tal como terapéuticos anti-cáncer, es que muchos de los compuestos utilizados para inhibir la proliferación de las células de cáncer también tienen efectos nocivos sobre la proliferación de células no cancerosas. Esto es especialmente problemático cuando se trata de cánceres que afectan a los niños, porque muchos de sus órganos y tejidos están en crecimiento y desarrollo. El uso de embriones de teleósteos transparentes, el efecto de un agente en la actividad de la angiogénesis, así como los posibles efectos secundarios o tóxicos pueden ser analizados

de forma simultánea. Los efectos secundarios o los efectos tóxicos de los agentes en las células de pez cebra y/o la embriogénesis pueden ser monitorizados en intervalos de tiempo después de la administración del agente. Típicamente, las mediciones se realizan al mismo tiempo como mediciones para evaluar la actividad de los agentes administrados.

G. Procedimientos de cribado de la angiogénesis

- 5 **[0077]** La presente invención proporciona procedimientos de cribado de un agente para una habilidad o capacidad de un agente para mejorar, inhibir o bloquear la actividad de la angiogénesis en un teleosteo en respuesta a la administración de una dosis de un agente al teleosteo. La actividad de la angiogénesis se evalúa en relación con los teleosteos de control contemporáneos y/o históricos (o tejidos, órganos o células de los mismos) para los que el agente no se ha administrado. - La actividad de la angiogénesis se refleja en cambios en la vasculatura de los teleosteos. La
- 10 formación de los vasos sanguíneos y su desarrollo pueden ser monitorizados a lo largo del tiempo en los teleosteos a los que les ha sido administrado un agente, así como en los teleosteos de control. Una respuesta que muestra un aumento en la formación normal de los vasos sanguíneos sugiere que el compuesto mejora o aumenta la angiogénesis. Una respuesta que muestra una disminución o reducción en la formación normal de los vasos sanguíneos o la muerte o la pérdida de los vasos sanguíneos existentes previamente establecidos sugiere que el compuesto reduce, impide o
- 15 inhibe la actividad de la angiogénesis (*es decir*, aumenta o estimula la actividad anti-angiogénesis) o interrumpe los vasos existentes. Las respuestas que indican una actividad angiogénica pueden detectarse en un teleosteo completo o en uno o más órganos o tejidos de un teleosteo, ya sea simultáneamente o por separado. Las respuestas pueden ser detectadas a lo largo del tiempo y en intervalos de tiempo predeterminados. Estas respuestas también pueden ser detectadas *in vitro* en células de un teleosteo.
- 20 **[0078]** Los procedimientos de la presente invención son útiles en la identificación de los agentes que podrían ser efectivos en el tratamiento terapéutico o profiláctico de una variedad de enfermedades que afectan a los procesos angiogénicos, como el cáncer, enfermedad arterial coronaria, insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad arterial periférica, enfermedad venosa periférica, enfermedades neurológicas, enfermedades cardiopulmonares, isquemia, enfermedades de desarrollo, enfermedades autoinmunes, y enfermedades de huesos y cartílagos. En general, estos
- 25 procedimientos son útiles en la detección de compuestos de la actividad terapéutica contra las enfermedades que se beneficiarían de un aumento en la actividad de la angiogénesis (*por ejemplo*, aumento de la formación de vasos sanguíneos) o disminución de la actividad angiogénica (*es decir*, la actividad anti-angiogénesis, una reducción en la formación de los vasos sanguíneos).
- [0079]** En un aspecto, los procedimientos comprenden la administración del compuesto que se cribarán a un
- 30 embrión de teleosteo sumergiendo el embrión en un medio de cultivo en el que el compuesto se ha disuelto antes de la aparición de vasculogénesis o angiogénesis. Después de un período adecuado (*por ejemplo*, 24 ó 48 horas), los embriones se fijan y se tiñen para un marcador endógeno de los vasos sanguíneos, tal como, *por ejemplo*, fosfatasa alcalina (AP). Una reducción o aumento en la formación de los vasos sanguíneos y cualquier perturbación en el patrón normal de los vasos sanguíneos se pueden determinar visualmente por microscopía de luz después de, *por ejemplo*,
- 35 tinción de fosfatasa alcalina, tinción con anticuerpos de una proteína, hibridación *in situ*. El órgano o función del tejido también se puede determinar midiendo la actividad enzimática.
- [0080]** Los compuestos que comprenden moléculas pequeñas típicamente penetran en los embriones de los teleosteos por simple difusión. Para los compuestos que no penetran en la peridermis (el ectodermo exterior), dimetilsulfóxido (DMSO) u otros solventes o choque osmótico se pueden utilizar para permeabilizar transitoriamente la
- 40 peridermis. Los compuestos también pueden ser administrados por otros procedimientos bien conocidos de administración, incluyendo ingestión o inyección directa en cualquiera del vitelo del embrión o el corazón del embrión de teleosteo. Una vez dentro del embrión, los compuestos se difunden libremente en el embrión.
- [0081]** Por ejemplo, para cribar un efecto de los compuestos sobre la actividad de la angiogénesis, los vasos subintestinales e intersomáticos son típicamente examinados. Para cribar un efecto de los compuestos sobre la actividad de la vasculogénesis, la aorta dorsal y vasos ventrales son examinados. Todos estos vasos son muy importantes en el
- 45 embrión de teleosteo no afectado y así sirven como un indicador ideal de los cambios en el patrón vascular. En particular, estos vasos son examinados para: 1) la presencia o ausencia de vasos, lo cual es indicativo de la inhibición de la angiogénesis, 2) la excesiva ramificación, lo cual es indicativo de la mejora de la angiogénesis, y 3) cambios en la arquitectura de la formación de vasos sanguíneos, lo cual es indicativo de los cambios en los eventos locales de señalización. En nuestros procedimientos se utiliza el embrión del pez cebra, ya que puede sobrevivir y desarrollarse durante 4-5 días sin un sistema circulatorio y, por lo tanto, los efectos de los agentes en todos los aspectos de la formación vascular en el embrión intacto se pueden evaluar fácilmente.
- 50 **[0082]** Los cambios en el patrón vascular puede ser estudiados mediante la realización de análisis de hibridación de ARN *in situ*, para examinar los angioblastos y los factores de crecimiento vascular, y microangiografía, para examinar la circulación y la función del corazón - todos los cuales tienen un papel en la formación de vasos sanguíneos. A modo de ejemplo, un compuesto que se cribarán se administra a un embrión de teleosteo de 24 horas mediante la disolución de los compuestos en el medio de cultivo que contiene el embrión en cultivo (antes de la aparición de vasculogénesis o angiogénesis). Después de un período adicional de 24 horas (a las 48 horas de desarrollo), el embrión es visualmente inspeccionado para detectar defectos morfológicos. El 50% de los embriones se
- 60 fijan para la hibridación *in situ* usando la sonda *flk-1* para identificar angioblastos. Los embriones que quedan se fijan a

las 72 horas de desarrollo y son teñidos con AP. Los compuestos que afectan a la expresión de la AP endógena, que dificulta al patrón vascular de ensayo mediante la tinción de AP, se pueden probar mediante el uso de microangiografía. Los embriones son examinados entonces para cualquier perturbación en el patrón normal de los vasos sanguíneos.

[0083] La actividad de la angiogénesis puede ser detectada mediante técnicas estándar indicadas anteriormente, incluyendo, *por ejemplo*, colorimetría, microscopía de fluorescencia (incluyendo, *por ejemplo*, fluorometría resuelta en el tiempo), quimioluminiscencia, análisis de imagen digital, técnicas estándar de lector de microplacas, software de reconocimiento de patrones para la respuesta de la discriminación y análisis, *etc.* La tinción de anticuerpos de epítomos específicos también se puede utilizar para detectar los cambios espaciales o temporales en la distribución y la expresión de epítomos en los tejidos de los teleósteos, así como las modificaciones moleculares.

10 H. Agentes de cribado para la actividad de la angiogénesis y/o actividad tóxica y/o actividad de la muerte celular simultáneamente

[0084] Los procedimientos para el cribado de los agentes para la actividad de la angiogénesis o anti-angiogénesis pueden combinarse con otros procedimientos de la presente invención que se describen a continuación, incluyendo los procedimientos de cribado de agentes para un efecto sobre la actividad de la muerte celular (Sección III) o la actividad tóxica (Sección IV). Como los teleósteos que se utilizan con estos procedimientos son transparentes, es posible evaluar la actividad de la angiogénesis o anti-angiogénesis en combinación con otras actividades. Las respuestas que indican las diversas actividades también pueden ser detectadas en conjunción con cualquier otra - ya sea en momentos distintos o de manera simultánea.

[0085] Estos procedimientos combinados son útiles en la evaluación de efectos múltiples de un agente en un teleósteo. El agente puede causar tanto una respuesta deseada como el mejoramiento de la angiogénesis, y una respuesta tóxica (no deseada). La capacidad de evaluar las múltiples actividades y las respuestas en un teleósteo debido a la administración de un agente es de gran beneficio en la identificación de compuestos con potencial terapéutico y la evaluación de sus efectos secundarios. Por ejemplo, una de las dificultades asociadas con la identificación de compuestos que pueden ser utilizados como terapias anti-cáncer contra células de cáncer diana es que algunos compuestos también pueden tener efectos nocivos sobre las células no cancerosas. La terapia anti-angiogénica contra el cáncer, por ejemplo, típicamente trata de inducir la apoptosis en células de cáncer, cortando el suministro de sangre de dichas células. Este tipo de régimen de tratamiento puede ser diseñado para inducir la apoptosis en los angioblastos como un medio para la prevención o disminución de la vascularización del tumor. Durante el tratamiento, debe lograrse un equilibrio, de tal manera que un nivel insignificante de muerte celular es inducido en otros tejidos o lugares en el cuerpo (como el corazón). Esta muerte celular no deseada ectópica puede ser considerada como una actividad tóxica. Un cribado de combinación para la evaluación de la angiogénesis, la muerte celular, y las actividades tóxicas de un agente sería útil en la identificación de los agentes que protegen el corazón de los agentes que inducen apoptosis en otros lugares. Los niveles de dosis del agente eficaz para promover una actividad sin promover también la otra pueden comprobarse. Tales cribados combinados también serían útiles en la identificación y la evaluación de los agentes para las terapias pro-angiogénicas que típicamente tienen el objetivo terapéutico de prevenir la muerte celular en un tejido dañado o trasplantado.

[0086] Múltiples actividades/respuestas pueden ser monitorizadas en el teleósteo completo o en uno o más tejidos u órganos del teleósteo. Estas actividades y respuestas pueden ser monitorizadas a lo largo del tiempo y en intervalos de tiempo predeterminados. Una variedad de técnicas se pueden utilizar juntas o por separado para analizar las múltiples actividades y las respuestas, incluyendo, por ejemplo, microscopía de fluorescencia, microscopía óptica, análisis de imagen digital, técnicas estándar de lector de microplacas (colorimetría, fluorometría, incluyendo fluorometría resuelta con el tiempo, y quimioluminiscencia), hibridación *in situ*, tinción de anticuerpos de proteínas específicas, cambios en la distribución de las proteínas en el tiempo y el espacio dentro del animal, cambios en un nivel de actividad enzimática en el teleósteo completo, o tejidos, órganos o células del teleósteo, *etc.* Además, la respuesta se puede discriminar y/o analizar mediante el uso de software de reconocimiento de patrones.

[0087] En un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de cribado de un agente para un aumento o disminución en la actividad de la angiogénesis tal como se describió anteriormente, que también comprende el cribado del agente para un aumento o disminución de la toxicidad mediante la detección de una respuesta en el teleósteo que indica un aumento o disminución de la actividad tóxica. Este procedimiento es útil, *por ejemplo*, en la identificación de contraindicaciones en el valor terapéutico de un compuesto.

[0088] En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento de cribado de un agente para un aumento o disminución en la actividad de la angiogénesis tal como se describió anteriormente, que también comprende el cribado del agente para la capacidad de aumentar o inhibir la actividad de la muerte celular mediante la detección de una respuesta en el teleósteo que indica un aumento o inhibición de la actividad de la muerte celular. Este procedimiento es útil, *por ejemplo*, en la identificación de contraindicaciones en el valor terapéutico de un compuesto. Estos cribados en combinación también permiten la identificación de los agentes que protegen el corazón de la circulación de agentes que inducen apoptosis en otros lugares.

Ejemplos1. Compuestos de cribado de la actividad de la angiogénesis en el pez cebraA. Materiales y procedimientos1) Recogida de embriones

- 5 **[0089]** Embriones de pez cebra fueron generados mediante apareamiento de pares natural tal como se describe en Westerfield, *supra*. Cuatro o cinco pares de peces cebra se crearon para cada apareamiento, en promedio, 100 a 150 embriones por pareja fueron generados. Los embriones fueron recogidos y colocados en medios de cultivo de huevo preparados mediante la combinación de 5 gramos (g) de Instant Ocean Salt con 3 g de sulfato de calcio en 25 litros de agua destilada a 27°C durante aproximadamente 20 horas (etapa de somitas 21) antes de ser ordenados para
- 10 viabilidad, usando la morfología y la etapa de desarrollo como criterio. Los embriones sanos se decloraron entonces mediante digestión enzimática usando 1 mg/ml de proteasa (Sigma Chemistry Co.) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los embriones se lavaron 5 veces en agua de embrión. Como el embrión del pez recibe el alimento de un saco vitelino conectado, sin requerir ningún mantenimiento adicional.

2) Compuestos cribados

- 15 **[0090]** Los compuestos de las siguientes dos fuentes fueron cribados para una habilidad o capacidad para mejorar o inhibir la actividad de la angiogénesis: librería de la Colección de compuestos sintéticos del Instituto Nacional del Cáncer, Bethesda, Maryland y del Centro para la Investigación del Cáncer, Instituto Tecnológico de Massachusetts (MIT), Cambridge, Massachusetts.

- 20 **[0091]** La librería de la Colección de compuestos sintéticos del Instituto Nacional del Cáncer se compone de más de 100.000 estructuras de compuestos únicos; en la actualidad sólo 12.000 están disponibles para cribado.

- [0092]** Los compuestos obtenidos en el MIT consistían en 11 derivados de la fumagilina, incluyendo PNT 470 (Turk et al. Bioorg. Med. Chem. 8:1163-1169 (1998)) y AGM-1470. La fumagilina es un producto natural aislado de hongo con un potentes efectos anti-angiogénicos y tóxicos. El AGM-1470 y otros derivados de la fumagilina son inhibidores de la angiogénesis, que impiden la entrada de células endoteliales normales, pero no transformadas, en la
- 25 fase G1 del ciclo celular mediante la unión de aminopeptidasa metionina de tipo 2 (MetAP2). Los derivados se suministran con una concentración inicial de 20 mM. Las muestras fueron diluidas en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Chemical Co.) con una concentración de stock de 10 mM.

- [0093]** Los compuestos del NCI fueron seleccionados al azar de la librería abierta de la Colección de compuestos sintéticos del NCI. Los compuestos fueron suministrados por el NCI en 96 conjuntos de microplacas, cada uno con una concentración inicial de 10 mM en DMSO. Ninguna información específica sobre la fuente de los compuestos, la actividad, la estructura química, o el mecanismo de acción estaba disponible.
- 30

3) Administración de compuestos

- [0094]** Para determinar el efecto(s) de un compuesto en la formación de vasos en un pez, el compuesto se añade directamente a la solución del medio de cultivo que contiene los embriones de peces (*por ejemplo*, a los micropocillos individuales que contienen los embriones de peces). Los compuestos fueron agregados a la solución del medio a las 12 ó 24 horas de desarrollo de los embriones de pez, que es anterior al punto en el cual los vasos angiogénicos pueden ser identificados primero con la sonda de hibridación *in situ* *flk-1*. Fouquet *et al.*, *supra*. Los ensayos se realizaron en placas de 6, 24, o 96 pocillos. Dichas placas facilitaron la automatización de la aplicación de productos químicos y los análisis posteriores, incluyendo la respuesta a la dosis, y su posterior análisis.
- 35

40 4) Cribado visual

- [0095]** Después de la administración de un compuesto a los embriones de peces, los embriones se mantuvieron en pocillos individuales a 28°C hasta el día 3 de desarrollo. Veinticuatro y cuarenta y ocho horas después de la adición del compuesto en el medio en el que los embriones de peces se cultivaron, los embriones fueron inspeccionados visualmente para detectar la viabilidad, graves defectos morfológicos, el ritmo cardíaco y la circulación (ver la Tabla 1). La circulación se analizó siguiendo el movimiento de las células de la sangre a través de cada embrión.
- 45

5) Tinción de los vasos

- [0096]** En el tercer día de desarrollo, los embriones fueron recolectados para la tinción de fosfatasa alcalina. Específicamente, los embriones fueron fijados en paraformaldehído al 4% y se tiñeron para la actividad endógena de la fosfatasa alcalina. Los embriones se fijaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Los embriones fueron lavados dos veces en tampón fosfato salino (PBS) y se deshidrataron por inmersión en un 25%, 50%, 75% y 100% de metanol en tampón fosfato salino con Tween 0,1% (PBT) para permeabilizar los embriones. Los embriones fueron rehidratados y se lavaron en PBT 100%. Para la tinción, los embriones fueron equilibrados en tampón NTMT (0,1 M Tris-HCl pH 9,5, 50 mM MgCl, 0,1 M NaCl, 0,1% Tween 20) a temperatura ambiente. Después del equilibrado de los embriones, los embriones se tiñeron mediante la adición de 4,5 l de 75 mg/ml tetrazolio nitro azul (NBT) y 3,5 l de 50 mg/ml de X-
- 50

fosfato por ml. Después de la tinción durante 10 minutos, todos los vasos sanguíneos en el embrión de pez fueron etiquetados (ver las figuras 2A-2C, 3A-3B, 4, 7). La reacción de la tinción fue detenida mediante la adición de PBST. Los embriones fueron examinados en un microscopio estéreo de disección. Una ventaja de usar el pez cebra para este tipo de análisis es que los vasos subintestinales, que se encuentran en el vitelo, son sensibles a los factores que realizan la formación de vasos y son fácilmente ensayados mediante este procedimiento (véase, *por ejemplo*, la figura 7). Los vasos subintestinales normalmente están presentes en la superficie dorsolateral del vitelo de los embriones de pez cebra a las 48 horas de desarrollo. Ellos forman una forma de cesta distinta que se extiende 50-100 µm desde el borde ventral del somito sobre el vitelo. Mediante el análisis de los vasos subintestinales a las 72 horas de desarrollo (24 horas después de que los vasos subintestinales aparezcan normalmente), se evitó la variación normal en el momento de la formación de vasos. El procedimiento de tinción se automatiza fácilmente usando la instrumentación disponible en el mercado.

6) Blanqueo de los teleósteos

[0097] Si se desea, los teleósteos (*por ejemplo*, embriones de pez cebra) se pueden blanquear antes o después de la tinción de fosfatasa alcalina. El blanqueo elimina el pigmento de melanina del teleósteo y permite el cribado del teleósteo sin los efectos adversos del tratamiento con 1-fenil-2-tiourea (PTU). El blanqueo después de la tinción también elimina las manchas extracelulares asociadas a la tinción de fondo. El blanqueo mejora efectivamente la visualización y el análisis de la respuesta del teleósteo tratado con un compuesto a través de la extracción de la pigmentación de algunas células. El blanqueo mejora la detección visual de las respuestas que indican las actividades tóxicas, angiogénicas y de muerte celular.

[0098] Para blanquear el pez cebra, los peces se sumergieron durante 10 minutos a temperatura ambiente en un formamida al 5%, citrato de sodio/cloruro de sodio 1X y peróxido de hidrógeno al 10%.

7) Hibridación *in situ*

[0099] Además de realizar cribados visuales, los cambios moleculares específicos en los tejidos de los teleósteos pueden ser detectados mediante hibridación *in situ* de ARN o tinción de anticuerpos de proteínas específicas. La hibridación *in situ* de ARN es un enfoque molecular de rutina en el pez cebra (Westerfield, *supra*). Un equipo de etiquetado con digoxigenina de Boehringer Mannheim puede ser utilizado para etiquetar las sondas de ARN. Todo el montaje de hibridación *in situ* puede llevarse a cabo de la siguiente manera: Los embriones son fijados con paraformaldehído al 4% en PBS, ligeramente digeridos con proteinasa K, y se hibridan con 1 µg de la sonda en la solución de hibridación *in situ* (50% de formamida, 5X SSC, 50 µg/ml de heparina, 500 mg/ml de ARNt, 92 µl de ácido cítrico 1 M, pH 6,0, y 0,1% Tween 20) a 65°C. El anticuerpo de anti-digoxigenina conjugada con fosfatasa alcalina se utiliza para detectar señales. La tinción de fondo de la fosfatasa alcalina endógena no representa un problema, porque la fosfatasa alcalina endógena no sobrevive al procedimiento de hibridación *in situ*. Después de la tinción con NBT/X-fosfatasa (Boehringer Mannheim), los embriones se blanquearon en metanol al 100%, se volvieron a fijar en paraformaldehído al 4% y se almacenan en PBS. Múltiples hibridaciones *in situ* se pueden realizar de forma simultánea en los diferentes teleósteos en placas de múltiples pocillos.

8) Ensayos adicionales para la angiogénesis

[0100] Para determinar si los cambios en el patrón vascular se deben a la inhibición o la estimulación de los angioblastos, se puede realizar un análisis de hibridación de ARN *in situ* sobre marcadores de angioblastos conocidos, *flk-1*, *tie*, *tek*, y *fli* (Dumont et al., Dev. Dyn. 203:80-92 (1995); Liao et al, Dev. Suppl. 124:381-389 (1996); Fouquet et al, *supra*) utilizando los procedimientos descritos anteriormente. *Flk-1* (figura 8), *tie*, y *tek* son receptores de quinasas de tirosina, que etiquetan los angioblastos pronto en el desarrollo. *Fli* es un factor de transcripción que los etiqueta en una etapa posterior. Como *flk-1*, *tie*, *tek*, y *fli* aparecen de forma secuencial durante el desarrollo de los angioblastos en los vertebrados (Dumont et al., *supra*), analizando la presencia o la ausencia de estas moléculas hace posible no sólo para determinar si los angioblastos se ven afectados, sino también la etapa de desarrollo en que se ven afectados.

[0101] Los cambios en la distribución de una proteína, tanto espacial como temporalmente, incluyendo una ausencia completa de una proteína, dentro del teleósteo intacto, se pueden detectar. Por ejemplo, los cambios en el patrón del factor de crecimiento endotelial vascular, VEGF, se pueden examinar utilizando los procedimientos estándar de tinción de anticuerpos (Westerfield, *supra*) o las técnicas de hibridación *in situ* descritas anteriormente (véase también Westerfield, *supra*). Se cree que el VEGF tiene dos papeles en el desarrollo vascular: 1) un quimio-atrayente o papel de orientación, y 2) un papel de mantenimiento (Dumont et al, *supra*). Por lo tanto, los productos químicos que afectan a la expresión de VEGF son de particular interés. Los anteriores son ejemplos bien conocidos de marcadores moleculares; otros marcadores moleculares también pueden ser empleados.

9) Ensayo de la función

[0102] Además de los cambios en la arquitectura vascular, la función vascular (circulación y frecuencia cardíaca) también pueden verse afectados por los compuestos. Para determinar si un compuesto se administra a un pez cebra con el funcionamiento vascular afectado (*por ejemplo*, el ritmo cardíaco y la circulación), se estudian el ritmo cardíaco y la circulación de los embriones de pez cebra. En este caso, la frecuencia cardíaca se evaluó contando los latidos del corazón/minuto. La circulación se evaluó mediante el examen de embriones de pez cebra con un microscopio

de disección para el movimiento de las células de la sangre por el corazón y los vasos mayores. Los embriones de pez cebra fueron examinados también para la acumulación de sangre en el vitelo (un indicador del flujo sanguíneo a través del corazón) y en el cuerpo del embrión (una indicación de los vasos permeables). En los embriones en los que se observó un compuesto que afecta el desarrollo de células sanguíneas, se realizó una micro-angiografía mediante los procedimientos descritos en Weinstein *et al.*, *Nature Med.* 1:1143 - 1147 (1995) para examinar la integridad del sistema vascular para la fuga y el bloqueo de los vasos, que puede causar cambios en la formación y el mantenimiento de los vasos. Los embriones fueron anestesiados con tricaina para detener el corazón, una micropipeta fue insertada en el corazón, y fueron inyectadas cuentas fluorescentes. La tricaina se lavó a continuación, y el corazón reanudó su latido. El flujo de las cuentas fluorescentes se observó a continuación, utilizando un microscopio de epifluorescencia y fue grabado con una cámara de luz de bajo nivel conectada a un ordenador (figura 9). Este enfoque permite el examen de la integridad del sistema vascular y la evaluación de los efectos de las sustancias químicas sobre la condición del corazón.

B. Resultados

1) Determinación de los parámetros para el suministro de los compuestos a los tejidos y órganos diana

15 a) Etapas de desarrollo del embrión

[0103] En nuestros estudios iniciales, se emplearon embriones de pez cebra de 12 horas (etapa de somitas 6) para los ensayos y comenzaron los ensayos a las 12 horas de desarrollo. Aunque este punto de tiempo es ventajoso, porque es justo antes del inicio de la formación de los angioblastos (Fouquet *et al.*, *supra*), hay varios inconvenientes. El más importante de los mismos es que a las 12 horas de desarrollo, muchas de las estructuras del embrión de pez cebra tales como la notocorda, las somitas, y el corazón están empezando a formarse. Como estas estructuras afectan directamente tanto a la vasculogénesis como a la angiogénesis, es difícil determinar si los efectos observados de los compuestos en la formación de vasos son primarios (efectos directos sobre los vasos) o secundarios (efectos indirectos debido a los daños a otros tejidos).

[0104] Para evitar este problema, comenzamos los ensayos a las 22 horas de desarrollo (etapa de somitas 26). En esta etapa del desarrollo, la aorta y la vena dorsal ventral están presentes en las regiones anteriores, pero no en las regiones posteriores del embrión de pez cebra. Esto permite el examen tanto de la vasculogénesis como de la angiogénesis de manera independiente en el mismo embrión. Para la vasculogénesis, se examinaron los embriones para detectar la presencia de la aorta dorsal y los vasos ventrales en las regiones más posteriores de la cola. Para la angiogénesis, se examinaron los embriones para detectar la presencia de brotes de vasos, incluyendo los vasos subintestinales y intersomáticos. Los vasos subintestinales comienzan a formarse a las 36 horas de desarrollo; por lo tanto, utilizando el punto de tiempo de 22 horas se reduce el tiempo entre la administración del compuesto y la formación de los vasos angiogénicos. Esta es una consideración importante para los compuestos que son inestables en las condiciones de cultivo.

b) Mantenimiento de los embriones

[0105] Los experimentos iniciales se realizaron en pocillos de 35 mm en placas de cultivo de 6 pocillos con 50 embriones de pez cebra por pocillo en 5 ml de agua de embriones. Aunque este enfoque funcionó, tiene una serie de inconvenientes, incluyendo que: 1) una cantidad relativamente grande de compuesto debe ser utilizado en la dosis de los embriones; 2) el número de compuestos que pueden ser seleccionados al mismo tiempo es limitado, y 3) como hay múltiples embriones en una placa, la muerte de los embriones podría contaminar los embriones vivos.

[0106] En un intento de evitar estos inconvenientes, se examinaron dos formatos alternativos, la placa de 96 y de 24 pocillos. Las observaciones previas indicaron que los embriones de pez cebra solamente fueron capaces de sobrevivir y desarrollarse normalmente en 50 a 100 l de agua de embriones durante un máximo de 5 días. Por lo tanto, hemos recogido, declorado y ordenado embriones de 22 horas en cualquiera de: 1) placas de 96 pocillos con un embrión por pocillo en 100 µl, o 2) placas de 24 pocillos con 5 embriones en 500 µl de agua de embriones. A los embriones se les permitió desarrollarse durante 72 horas antes del examen. Los embriones fueron evaluados por el tamaño, la morfología y el movimiento. No se observaron diferencias evidentes entre los embriones que se criaron en las placas de micropocillos y los embriones de control criados en recipientes más grandes. Los embriones fueron fijados y teñidos con fosfatasa alcalina endógena para examinar la formación de los vasos. El patrón de tinción de los embriones experimentales fue idéntico al observado en los controles. Para el cribado manual, se ha preferido el formato de 24 pocillos y se utilizó para todos los experimentos que se describen a continuación.

c) Suministro del compuesto

[0107] Con el fin de optimizar los parámetros de los compuestos de cribado, se realizaron una serie de experimentos utilizando los 11 derivados de la fumagilina obtenidos del MIT y 10 compuestos obtenidos al azar de la librería abierta de la Colección de compuestos sintéticos del NCI. Sabíamos que a partir de nuestros estudios de factibilidad que la fumagilina inhibió la angiogénesis en el pez cebra; por lo tanto decidimos utilizar estos compuestos como controles positivos para verificar el ensayo. También se utilizaron los 10 compuestos de NCI para verificar que los parámetros establecidos eran apropiados para otros tipos de compuestos. En general, esperamos que las pequeñas moléculas se difundieran libremente en el embrión y a través de la membrana del corion que rodea al embrión durante

los primeros 2-3 días de desarrollo. Sin embargo, para evitar posibles problemas, hemos eliminado el corion mediante digestión enzimática. Este enfoque está bien establecido y cuando se hace adecuadamente, no produce efectos adversos en los embriones.

Tabla 1. Resumen de los efectos de la concentración de los compuestos

Compuesto	100 μ M	Efecto	10 μ M	Efecto	1 μ M	Efecto
MIT (11)	11/11	Letal	7/10	Efectos vasculares	11/11	Leve retraso en el desarrollo
				Retraso en el Desarrollo		
NCI (10)	4/10	Letal	1/10	Letal	1/10	Letal
	6/10	Leve retraso en el desarrollo	2/10	Cambio cromático	10/10	Leve retraso en el desarrollo
			10/10	Leve retraso en el desarrollo		

d) Concentración del compuesto

[0108] Como un cribado primario para los efectos de los compuestos, probamos cada compuesto en tres concentraciones diferentes para determinar la concentración que dará la mayor información. Las concentraciones ensayadas fueron de 100 μ M, 10 μ M, y 1 μ M. Los resultados se resumen en la Tabla 1. Para estos experimentos, hemos añadido 50 μ l de solución de stock 10 mM en 5 ml de agua de embriones para generar una solución 100 μ M en DMSO al 1%. Las concentraciones posteriores fueron generadas mediante diluciones de 1:10 y 1:100 en agua de embriones; para cada concentración, se añadió DMSO al 1% de la solución total. Las soluciones de control consistieron en DMSO al 1% en agua de embriones. Diez embriones por compuesto por concentración se probaron. De los 21 compuestos analizados, 15 (11/11 MIT, 4/10 NCI) fueron letales en la concentración de 100 μ M. En la concentración de 10 μ M, 7/11 de los derivados de la fumagilina tuvieron un efecto inhibitor de la angiogénesis. Sin embargo, aunque ninguno de los derivados de la fumagilina fueron letales en 10 μ M, todos tenían un efecto perjudicial sobre el crecimiento del embrión (figura 2A), en consonancia con los resultados previamente publicados que muestran que el objetivo de los derivados de la fumagilina es la aminopeptidasa de metionina (tipo 2), que desempeña un papel en el control del ciclo celular en las células eucariotas (Ishikawa et al, J. Exp. Ther. Oncol. 6:390-396 (1996); Kria et al, Curr. Eye Res. 10:986-993 (1998).

[0109] A diferencia de los derivados de la fumagilina, en 10 μ M los compuestos del NCI no tuvieron ningún efecto observable en la formación de los vasos. Sin embargo, uno de los 10 compuestos del NCI fue letal en esta concentración y 2 de los 10 compuestos provocó un cambio cromático en los embriones. Los cambios cromáticos no se limitaron simplemente a tomar el color del compuesto, uno de los compuestos del NCI causó que los melanocitos se volvieran morados. Al igual que con los derivados de la fumagilina, los 9 compuestos no letales del NCI causaron un ligero retraso en el desarrollo, porque los embriones aparecieron mediante criterios morfológicos para retrasarse ~12 horas en el desarrollo. En 1 μ M, 20/21 compuestos causaron retraso en el desarrollo y 1/21 causaron letalidad. Estos resultados muestran claramente que los compuestos añadidos al medio eran capaces de entrar en el embrión de pez cebra e inducir un efecto.

e) Uso de DMSO

[0110] Un problema con las condiciones experimentales descritas anteriormente es que el control de los embriones mantenidos en DMSO al 1% en agua de embriones también mostró un ligero retraso del desarrollo, similar al observado para todas las concentraciones de los compuestos del NCI y para la concentración de 1 μ M de los derivados de la fumagilina. Hemos repetido los experimentos con las concentraciones de 10 μ M y 1 μ M de los compuestos, respectivamente, en DMSO al 1%. Los resultados fueron idénticos a los de la Tabla 1, excepto que el retraso en el desarrollo de todos los compuestos, excepto los derivados de la fumagilina en la concentración de 10 μ M fue eliminada. Después de realizar estos experimentos, hemos decidido utilizar concentraciones de 10 μ M con DMSO al 0,1%. Los resultados indicaron que en concentraciones relativamente altas, el DMSO tiene algún efecto en el desarrollo del pez cebra. Mientras que el DMSO no parece tener ningún efecto en el desarrollo del pez cebra en concentraciones más bajas, somos conscientes de que pueden producirse efectos sinérgicos. Desafortunadamente, muchos de los compuestos disponibles para el cribado sólo eran solubles en DMSO o disolventes similares. Al igual que con cualquier cribado primario, los resultados positivos requerirán más verificación y escrutinio.

2) Evaluación de los efectos de los compuestos en la formación de los vasos sanguíneos

[0111] Después de establecer los parámetros básicos de ensayo, se cribaron compuestos examinados del

MIT (11 compuestos) y del INC (190 compuestos) para los efectos sobre la formación de los vasos sanguíneos (angiogénesis y vasculogénesis). Los embriones fueron recolectados con 20 horas de desarrollo y se declonaron. A las 22 horas de desarrollo, los embriones fueron ordenados en placas de 24 pocillos con 5 embriones por pocillo en 500 μ l de agua de embriones. Los compuestos del MIT y del NCI se añadieron a una concentración de 10 μ M. Para cada compuesto, 3 series de embriones (15 en total) fueron cribados. Para mayor comodidad, cada conjunto se mantuvo en una placa de múltiples pocillos separada. Esto permitió probar 23 compuestos/placa con 1 conjunto de controles por placa. A las 72 horas de desarrollo, los embriones fueron examinados visualmente por graves defectos morfológicos y la función cardíaca mediante un microscopio de disección. Después del cribado visual, los embriones fueron fijados y teñidos para la actividad endógena de la fosfatasa alcalina con el fin de analizar la arquitectura vascular. Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 2 y se describen a continuación.

Tabla 2. Resultados del cribado visual

(Com-puestos)	Número de compuestos cribados	Cambios vasculares	Retraso del desarrollo	Defectos axiales	Defectos craneales	Defectos de Circulación/ritmo cardíaco	Compuestos tóxicos a 10 μ M
NCI	190	18	16	6	7	6	13
MIT	11	7	11	3	0	0	0

a) Cambios vasculares

[0112] Para ensayar la formación de vasos, los embriones fueron fijados y teñidos y los vasos se puntuaron tal como se describió anteriormente. Los vasos subintestinales forman en la superficie dorsolateral del vitelo en ambos lados del embrión en la forma de un saco que se extiende 50-100 μ m desde el borde ventral de la somita sobre el vitelo. Para este cribado, se definieron los efectos anti-angiogénicos como la ausencia total de estos vasos o la pérdida de cualquiera de los vasos laterales o dorsolaterales del saco (figuras 2B-2C, 3B, 4). Un efecto angiogénico se ha definido para este cribado como una ampliación del saco más allá de 150 μ m de la somita. Esto incluye tanto los aumentos en el tamaño del saco total y/o proyecciones del saco (figuras 6A, 6C, 6D). Además del tamaño del saco total, también hemos buscado aumentos en el diámetro de los vasos. Los vasos normales son inferiores a 10 μ m de diámetro. Los embriones también fueron cribados para grandes cambios en los vasos mayores, incluyendo la aorta dorsal y la vena ventral.

[0113] De los 241 compuestos analizados, 25 (7/11 del MIT y 18/190 del NCI) causaron algunos efectos anti-angiogénicos (Tabla 3). De estos, 23/25 se asociaron con diversos grados de retraso en el desarrollo; cuanto más grave es el retraso, más dramática fue la reducción en la formación de los vasos (figuras 2A-2B). De los otros dos compuestos que causaron una reducción o pérdida en la formación de los vasos, uno estaba asociado con un truncamiento del eje embrionario (figura 4). Los defectos axiales generalmente no causan una pérdida de los vasos subintestinales, lo que sugiere que el efecto de los vasos puede ser distinto del efecto axial. Sólo 1 de los compuestos probados mostró un efecto específico sobre la formación de los vasos. Con este compuesto, se produjo una pérdida de los vasos subintestinales (figura 2B), sin efectos observables sobre el embrión.

Tabla 3. Efectos observados de los compuestos en la formación de los vasos

Com-puestos (Fuente)	Efecto de vasos	Pérdida completa de los vasos subintestinales (SIV)	Pérdida de los vasos laterales o dorsolaterales de SIVs	Aumento en SIVs	Aumento en el diámetro del vaso	Cambios en los vasos mayores
MIT (11)	7/11	4	3	0	0	5
NCI (190)	18/190	5	13	0	0	3

[0114] Con 8/25 compuestos que causaron efectos angiogénicos, se observó lo que parecía ser un fracaso de los vasos mayores para organizarse adecuadamente en la cola. Sólo se observó este efecto con los compuestos que indujeron un grave retraso en el desarrollo. Es probable que el fracaso de la aorta y la vena ventral de organizar adecuadamente pueda ser un efecto secundario. Curiosamente, ninguno de los compuestos examinados provocó un aumento en la formación de vasos como los ensayados mediante el aumento en el tamaño de los vasos subintestinales o el diámetro de los vasos.

[0115] Para determinar si la pérdida de los vasos subintestinales se debió a la pérdida de angioblastos, se realizó un análisis *in situ* de los embriones tratados con los compuestos que previamente habían mostrado que causaban una reducción de la formación de los vasos. Se utilizó una sonda contra *flk-1*, un receptor de tirosina quinasa que se ha demostrado que desempeña un papel fundamental en la formación de los vasos angiogénicos (Hanahan, *supra*). *Flk-1* ha demostrado ser el marcador más precoz de angioblastos en el embrión del pez cebra (Fouquet *et al.*, *supra*). Normalmente, *flk-1* es altamente expresado a través del desarrollo de vasos de nueva formación y se expresó

en niveles más bajos en los vasos mayores después su formación. En ausencia de vasos angiogénicos, no podemos esperar para ver la expresión del *flk-1* en la región somítica y subintestinal; por lo tanto, nos hemos centrado en la expresión de *flk-1* en los vasos mayores.

5 **[0116]** Los embriones fueron recolectados a las 48 horas de desarrollo (24 horas después de la adición de los compuestos), ya que *flk-1* sigue siendo altamente expresado en los vasos mayores en esta etapa. Para 17 de los 18 compuestos del NCI, que causaron una reducción en los vasos subintestinales, el patrón de la tinción con *flk-1* parecía normal a las 48 horas de desarrollo. En concreto, la tinción con *flk-1* estuvo presente en la aorta dorsal y la vena ventral, así como en los vasos de la cabeza. No había tinción en el espacio intersomítico o en la superficie dorsal del vitelo, sin embargo; esto se esperaba porque estos vasos no la formaron. Un compuesto causó una pérdida de tinción con *flk-1* en 10 los vasos mayores de la cola, pero no en la cabeza. Este compuesto también causó un truncamiento del embrión, un adelgazamiento de la cola y malformaciones del corazón (figura 5). Es probable que la pérdida de la tinción con *flk-1* fuera parte de un defecto más global, más que un efecto anti-angiogénico específico.

b) Retraso en el desarrollo

15 **[0117]** Debido a que varios de los defectos incluyeron cambios en el tamaño y la forma del embrión, para distinguir entre los defectos morfológicos y de retraso del desarrollo, hemos utilizado tres parámetros distintos. Normalmente, los embriones de pez cebra se organizan por la posición de la cabeza en el saco vitelino, la longitud del embrión, y la posición de la formación de los melanocitos. Para nuestro 4º criterio, se utilizó el tamaño y la forma de las aletas para ayudar en la organización de los embriones. Para este cribado, el retraso en el desarrollo se definió como al menos 12 horas más lento que en los embriones de control en la misma placa de múltiples embriones. Como se señaló 20 anteriormente, todos los derivados de la fumagilina causaron un retraso considerable en el desarrollo de al menos 24 horas (figura 2A-2C). Esto es probablemente porque el objetivo de estos compuestos es una proteína que regula el ciclo celular (Turk *et al.*, *supra*). El retraso en el desarrollo también se observó en 16 de los 190 (8,5%) compuestos de pequeñas moléculas del NCI. En todos los casos se observó un retraso de desarrollo, se produjo un cambio en la arquitectura vascular consistente con el retraso en el desarrollo (figuras 2A-2C). Es probable que los compuestos que 25 afectan a la proliferación y al crecimiento también afectarán a la formación de vasos angiogénicos, que requiere la proliferación de células con el fin de formar nuevos vasos. Ocho de estos 16 compuestos también causó que pareciera una desorganización de los vasos mayores en la cola.

c) Defectos axiales

30 **[0118]** Había tres tipos típicos de defectos axiales: 1) flexión del eje hacia arriba o hacia abajo (NCI 3/6, MIT 3/3), 2) truncamiento del eje (NCI 2/6), y 3) ampollamiento de la notocorda (figura 5) (NCI 2/6). Una reducción de los vasos subintestinales se observó con sólo uno de los compuestos que causó un defecto axial (figura 4).

d) Defectos craneales

35 **[0119]** Los defectos craneales se definen como la alteración de la morfología del sistema nervioso central (SNC), usualmente en la frontera del cerebro medio/parte posterior del cerebro, o la presencia de restos celulares en el espacio ventricular del CNS. Siete de los 190 compuestos del NCI causaron defectos craneales; sin embargo, ninguno afectó a los vasos subintestinales o a los vasos mayores en la cola.

e) Toxicidad

40 **[0120]** Para este experimento específico, definimos la toxicidad como la letalidad del embrión completo a las 72 horas de desarrollo. Utilizando los parámetros de ensayo previamente establecidos, predijimos que la concentración de 10 µM de un compuesto es poco probable que produzca toxicidad. Por lo tanto, no nos sorprendió que sólo el 5% (NCI al 6,8%, 13/190) de los compuestos ensayados fueron letales. De los 13 compuestos letales, ocho mataron los embriones dentro de las 24 horas de aplicación. Los 5 compuestos restantes causaron la muerte celular localizada (4 en la cola y 1 en la cabeza) dentro de 24 horas y la letalidad el embrión completo a las 72 horas de desarrollo. Es posible 45 que en concentraciones más bajas estos compuestos puedan afectar a la angiogénesis sin causar toxicidad; sin embargo, esto parece poco probable, ya que los efectos tóxicos eran bastante globales.

3) Evaluación de los efectos sobre la función vascular

a) Defectos de circulación/ritmo cardíaco

50 **[0121]** Hubo una serie de compuestos que causaron el retraso en el desarrollo y defectos axiales que también causaron cambios estructurales en el corazón. En general, estos efectos fueron consistentes con el subdesarrollo del corazón. Con el fin de evaluar la función, hemos restringido nuestro análisis a los embriones en los que el corazón parecía relativamente normal, tal como se define por la presencia de una aurícula y un ventrículo, así como un latido. 6/190 de los compuestos del NCI causaron una reducción en la frecuencia de latido del corazón. Para este cribado, la tasa de reducción del corazón se define como menos del 50% o que la tasa de control. Como factores biológicos y ambientales causan las variaciones naturales en el ritmo cardíaco, la frecuencia cardíaca normal se tomó 55 como la frecuencia cardíaca media de los 10 embriones en los pocillos de control para cada placa. Esto se comparó con la frecuencia cardíaca media de los embriones en el pocillo experimental. En 3/6 compuestos, edema pericárdico y

5 acumulación de sangre en el vitelo acompañó a la tasa reducida. A pesar de que el edema pericárdico era evidente, las células sanguíneas se movieron a través de los vasos sanguíneos principales. Los tres de estos compuestos causaron retraso en el desarrollo con una reducción asociada en los vasos angiogénicos; en concreto, los vasos subintestinal estaban ausentes. Los restantes tres compuestos no tuvieron ningún efecto observable diferente de la menor frecuencia cardíaca.

10 **[0122]** Ninguno de los compuestos no letales probado causó una reducción observable en el número de células de la sangre, por lo que era posible el ensayo de la circulación mediante la observación del movimiento de las células de la sangre por los vasos. Al igual que con la evaluación de la frecuencia cardíaca, sólo se analizaron los embriones con un corazón estructuralmente normal, porque los corazones malformados o subdesarrollados usualmente no pueden bombear sangre. Ninguno de los compuestos que parecía afectar a la circulación según lo evaluado por falta de flujo sanguíneo, agrupación de sangre o vasos con fugas.

15 **[0123]** La circulación se analizó mediante la observación del flujo de sangre a través de las células del embrión. De los 212 compuestos probados en este estudio, ninguno afectó la formación de las células de la sangre, por lo que no era necesario realizar ningún microangiograma para analizar la circulación. Sin embargo, debido a que es poco probable que este sea el caso para todos los compuestos, la técnica de microangiograma normalmente se incluye como parte de los procedimientos de detección. Un microangiograma se realizó como parte de nuestros estudios iniciales en un embrión de pez cebra en el tercer día de desarrollo. El microangiograma muestra el patrón vascular normal del embrión de pez cebra, incluyendo los vasos craneales, intersegmentales y subintestinales. Ver la figura 9.

C. Discusión

20 **[0124]** Los resultados anteriores demuestran que los teleósteos (*por ejemplo*, el pez cebra) es un modelo viable para el cribado de pequeñas moléculas (*por ejemplo*, compuestos químicos) por sus efectos sobre la formación de los vasos. Tales moléculas pequeñas no sólo se difunden en el embrión, sino que también pueden inducir efectos específicos, observables en la formación de los vasos sanguíneos.

1) Difusión de pequeños compuestos en el embrión del teleósteo

25 **[0125]** Una de las principales preocupaciones antes de la experimentación era si los diferentes tipos de moléculas pequeñas se difundirían en los embriones de pez cebra después de la adición al medio. Nuestros estudios iniciales demostraron que la fumagilina y la ovicillina eran capaces de difundirse en el embrión de pez cebra. Sin embargo, estos compuestos son productos naturales identificados debido a su capacidad para difundirse en las células en cultivo. De los 201 compuestos de pequeñas moléculas examinados, 81 tuvieron algún efecto observable en embriones de pez cebra (70/190 compuestos, incluyendo 23 que causaron cambios de color (datos no mostrados), del NCI y 11/11 derivados de la fumagilina). Estos resultados sugieren que nuestra hipótesis inicial de que las pequeñas moléculas entrarían por difusión en los embriones era correcta.

2) Ventajas del cribado de embriones completos

35 **[0126]** Una ventaja significativa de la utilización de embriones de teleósteos completos para los ensayos es la capacidad de identificar los efectos sobre los objetivos de forma simultánea. En nuestra primera serie de experimentos, limitamos los objetivos adicionales a los eventos que pudieran visualizar sin tintado adicional. El retraso en el desarrollo fue el más útil de estos parámetros. A diferencia de los ensayos de cultivo celular, con el ensayo del embrión completo, pudimos observar que 11 compuestos del MIT causaron lo que parecía ser en general efectos la proliferación celular, que puede o no ser el mismo que los efectos anti-angiogénicos. Esto puede ser debido a la unión de tipo 2 de aminopeptidasa metionina (MetAP2) (Turk *et al.*, *supra*) o una proteína relacionada con el ciclo celular.

40 **[0127]** También se observó una serie de otros efectos con otros compuestos. Con 6 compuestos, se observaron efectos sobre la frecuencia cardíaca en embriones vivos mediante inspección visual. Como el corazón es muy importante en el embrión temprano, se pudo observar una frecuencia cardíaca lenta en comparación con la normal mediante inspección visual. Dos posibles mecanismos para este efecto observado son los siguientes: 1) el compuesto puede afectar al desarrollo del corazón de tal manera que el mecanismo de la conductividad necesario para latido normal del corazón está ausente, o 2) el compuesto antagoniza directamente el mecanismo de la conductividad de una manera similar a beta-bloqueantes (Reiter y Reiffel, Am. J. Cardiol. 82 (4A):9-19 (1998)). También fuimos capaces de marcar defectos craneales en 7/201 compuestos, así como defectos axiales en 9/201. En estudios posteriores (descritos más adelante), se utilizaron anticuerpos específicos y técnicas de tinción para analizar los efectos de los compuestos en otros órganos, incluyendo el hígado y el riñón, para determinar los efectos adversos de los compuestos angiogénicos. El hígado y los riñones están altamente vascularizados, por lo tanto, estos órganos representan objetivos potenciales para los compuestos de la detección de efectos adversos en la formación de los vasos sanguíneos.

3) Detección de efectos anti-angiogénicos

55 **[0128]** En nuestra primera serie de experimentos de cribado de efectos anti-angiogénicos, se examinó el efecto de la fumagilina, un producto químico natural de la anti-angiogénesis, en la formación de vasos sanguíneos en el embrión de pez cebra. El compuesto se administra además del medio de cultivo de peces. Este compuesto produjo una reducción en la angiogénesis, indicada por una reducción de los vasos subintestinales e intersomáticos (*véase, por*

ejemplo, la figura 7). Sin embargo, cada compuesto también causó complicaciones graves en el embrión como edema pericárdico, retraso del desarrollo, y defectos axiales. A pesar de que estos experimentos demostraron la viabilidad del enfoque para la detección de fármacos, también subrayó la importancia de la identificación de compuestos que afectan selectivamente la angiogénesis. Utilizando los parámetros de selección que se han descrito anteriormente, se identificaron dos compuestos que causaron aparentemente efectos anti-angiogénicos específicos. Además, se identificaron 16 compuestos diferentes que provocaron una reducción de la formación de vasos angiogénicos, además de otros efectos. Estos resultados muestran que el modelo de embrión de pez cebra puede ser utilizado para el cribado de compuestos que afectan específicamente a las actividades de la angiogénesis y a las actividades de la anti-angiogénesis.

10 4) Cribado para la formación de angioblastos usando tinción del *Flk-1*

[0129] 1 de los 18 compuestos del NCI que causaron una reducción en la formación de vasos subintestinales tuvo un efecto en la patrón de tinción del *flk-1*. Debido a que el *flk-1* es un marcador precoz de los angioblastos, este resultado sugiere que para 17/18 compuestos, el bloqueo de la angiogénesis no es debido a la pérdida de angioblastos, sino más bien a la interferencia con algún otro componente de la vía angiogénica. Para el compuesto que afectó a la tinción con *flk-1*, no estaba claro si la pérdida de coloración se debió a una pérdida de angioblastos o a una pérdida de la expresión de la tirosina cinasa del *flk-1*. Esto demuestra la importancia de establecer indicadores para ambos angioblastos y la vía angiogénica (véase más adelante).

15 5) Efectos angiogénicos

[0130] Ninguno de los compuestos ensayados provocó un aumento observable en la formación de los vasos. Dos posibles explicaciones de esta observación son las siguientes: 1) ninguno de los compuestos ensayados tenían propiedades angiogénicas, y 2) el embrión de pez cebra normal es refractario a la estimulación exógena angiogénica. Para distinguir entre estas dos posibilidades, hemos realizado experimentos, que se describe a continuación, en el que se inyectó VEGF en embriones de 24 horas. Estos experimentos sugirieron que un aumento de la angiogénesis puede ser inducido en el embrión de pez cebra normal (figuras 5A-5C). Con el fin de aumentar la probabilidad de identificar los compuestos que estimulan la angiogénesis, se exploró el uso de líneas de pez cebra mutante, tal como el mutante de estancamiento (Weinstein *et al.*, *supra*), que tiene defectos que bloquean la angiogénesis.

25 6) Vasculogénesis

[0131] En el pez cebra como en los seres humanos, la vasculogénesis es el proceso por el cual los vasos mayores, incluyendo la aorta, la vena cava y vasos en ciertos órganos, se forman a partir de células precursoras locales (angioblastos) distribuidas en todo el mesodermo del embrión (Fouquet *et al.*, *supra*). Hemos observado defectos vasculares con 8 de los 241 compuestos examinados. Los efectos observados se limitaron a una desorganización de la aorta dorsal y el vaso ventral en embriones con un retraso de desarrollo severo. No está claro que la vasculogénesis exija la proliferación celular extensa, y los efectos observados en los vasos mayores pueden ser debidos a una alteración de los tejidos circundantes, en lugar de un efecto directo sobre los angioblastos.

35 7) Procedimientos rápidos y automatizados de detección de agentes para la actividad de la angiogénesis

[0132] Nuestros experimentos demostraron la versatilidad y el valor de los teleosteos como modelo para su uso en la detección, identificación y análisis de los compuestos que inhiben o mejoran la angiogénesis *in vivo* e *in vitro*. Con los procedimientos de la presente invención, los teleosteos (*por ejemplo*, embriones de pez cebra) pueden ser utilizados para cribar un gran número de compuestos con rapidez por los efectos sobre la angiogénesis. Por ejemplo, utilizando el formato de 24 pocillos y técnicas manuales para realizar cambios de fluido, se cribaron 241 compuestos para una variedad de efectos en múltiples puntos de tiempo. Estos efectos incluyen defectos morfológicos, defectos funcionales, y letalidad. Aunque estos efectos objetivo proporcionan una enorme cantidad de información, el análisis de otros objetivos tales como el ritmo cardíaco, la circulación, y otros órganos constituyen un segundo nivel de evaluación que debe realizarse sólo en los compuestos preseleccionados por los efectos angiogénicos. Un cribado primario de los compuestos que afectan a la angiogénesis debe centrarse en los vasos subintestinales tintados en embriones de 72 horas.

[0133] La presente invención también incluye procedimientos automatizados para el cribado rápido de los compuestos que aumentan o inhiben la actividad de la angiogénesis en modelos animales *in vivo* e *in vitro* en células de los mismos. Modelos preferidos de los animales son teleosteos transparentes, tales como el pez cebra. Cualquiera de los compuestos descritos en este documento puede ser evaluado usando procedimientos automatizados descritos anteriormente, incluyendo, *por ejemplo*, pequeños compuestos químicos o grandes moléculas biológicas descritas a continuación.

[0134] En nuestros análisis descritos anteriormente, se revisaron los 190 compuestos de la librería abierta de la Colección de compuestos sintéticos del NCI. Aunque esta librería consta de más de 100.000 estructuras de compuesto único, en la actualidad sólo 12.000 están disponibles para su revisión. Utilizando los procedimientos de selección manual de la invención, toda la librería de compuestos puede ser cribada en dos años. La incorporación de instrumentos de manipulación de fluidos disponibles en el mercado reduce de forma significativa este período de tiempo a menos de tres meses.

2. Cribado de las moléculas biológicas para la actividad de la angiogénesis

[0135] La presente invención también incluye procedimientos de cribado de las moléculas más grandes, incluyendo moléculas biológicas, para su capacidad para mejorar o inhibir la actividad de la angiogénesis. Estos procedimientos comprenden la administración del compuesto a un teleósteo y la detección de una respuesta que indica una mejora o inhibición de la actividad de la angiogénesis. No existe en la actualidad un procedimiento preciso para el cribado de grandes moléculas biológicas para la actividad de la angiogénesis. Por lo tanto, los procedimientos de la invención tienen un valor especial y el uso de compuestos biológicos en la evaluación de la utilización como agentes terapéuticos y/o profilaxis en el tratamiento de una variedad de enfermedades en humanos asociadas con los procesos de angiogénesis, incluyendo enfermedades neurológicas, enfermedades cardiopulmonares, isquemia, enfermedades de desarrollo, enfermedades autoinmunes, enfermedades de huesos y cartílagos, y cáncer.

[0136] Una amplia gama de compuestos biológicos, incluyendo péptidos, proteínas, glicoproteínas, ácidos nucleicos (*por ejemplo*, ADN y ARN), lípidos, glicolípidos, y similares, incluyendo, pero no limitado a, derivados, análogos, y quimeras de estos compuestos, pueden ser cribados mediante estos procedimientos. Como se mencionó anteriormente, los compuestos de una librería de compuestos, incluyendo una librería combinatoria, pueden ser cribados.

[0137] Recientemente, una serie de moléculas biológicas han sido identificadas que tienen efectos anti-angiogénicos bien o angiogénicos (Hanahan, *Science* 277 (5322):48-50 (1997); Zetter, *supra*). Algunos de los compuestos biológicos se han caracterizado y analizado para la actividad de la angiogénesis en cultivos celulares y en ratones; unos pocos de tales compuestos han sido probados en los programas de tratamiento terapéutico y/o profiláctico en los seres humanos. La comparación de los resultados obtenidos con estos compuestos y el modelo de teleósteos y los procedimientos de selección de la presente invención permitiría una determinación acerca de si el modelo de teleósteos y los procedimientos de detección descritos en este documento son un factor predictivo del efecto terapéutico en los seres humanos; esta comparación sería beneficiosa para determinar si un compuesto ensayado sería útil en los programas de tratamiento terapéutico y/o profiláctico de los trastornos relacionados con la angiogénesis en los seres humanos.

A. Proteínas

[0138] Para examinar los efectos de las proteínas y los fragmentos de proteínas (y péptidos y fragmentos de péptidos) sobre la angiogénesis en embriones de teleósteos, las proteínas (y fragmentos de proteínas y fragmentos de péptidos) fueron inyectados directamente en la circulación de embriones de pez cebra de 24 horas. Los embriones fueron recolectados y declorados tal como se describió anteriormente. Los embriones fueron ordenados luego en rampas de sujeción hechas de agarosa al 1% en agua de embriones y orientados con el saco vitelino sobresaliendo hacia arriba. Una inyección de microinyección se realizó de la siguiente manera: las proteínas se suspendieron en PBS y se rellenaron en una micropipeta de vidrio. La micropipeta se adjunta a continuación a un micromanipulador y un picospritzer (General Valve) conectado a un tanque de nitrógeno. Utilizando el micromanipulador, la punta de la micropipeta se inserta en el embrión y una pequeña cantidad de solución de proteína se expulsa de la punta con presión positiva. Para determinar si nuestro modelo animal podría utilizarse con eficacia para el cribado de estos compuestos, se realizaron una serie de experimentos en los que se inyectó una de dos proteínas diferentes que tienen efectos opuestos sobre la formación de los vasos - endostatina humana (O'Reilly et al, *Cell* 88. (2):277-285 (1997)) y el factor humano de crecimiento endotelial vascular (VEGF) - en un embrión. La endostatina, un fragmento del colágeno XVIII, es una proteína endógena, con potente actividad anti-angiogénica. La VEGF se ha demostrado que juega un papel fundamental en la determinación de las células endoteliales, así como en la formación de los vasos. En experimentos preliminares, se inyectó la proteína VEGF ya sea en el saco vitelino o en el espacio perivitelino entre el vitelo y la peridermis. Como la segunda ubicación está en la trayectoria del retorno venoso, las proteínas terminan en la circulación del embrión. Para rellenar las pipetas de inyección, se utilizó una solución de 2 mg/ml de VEGF. Cuando el VEGF se inyecta en el vitelo, se observaron dos fenotipos angiogénicos: 1) la aparición de puntos largos que sobresalen del saco de vasos subintestinales (figura 6), y 2) aumento de diámetro de vasos en el saco subintestinal (figura 6C). En contraste, las inyecciones de VEGF en el espacio perivitelino llevó a una interrupción de la formación de los vasos (figura 6D) y el desarrollo del corazón. Esto es consistente con las observaciones de otros vertebrados. Drake et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (17):7657-7661 (1995); Fouquet et al, *supra*. La endostatina se inyectó en el pez cebra como si fuera VEGF. En contraste con el VEGF, los resultados de la endostatina eran inconsistentes y, por lo tanto, no se pueden interpretar. Estos experimentos demostraron que los cambios en el patrón vascular pueden ser inducidos en el modelo animal. Además, debido a que las proteínas humanas producen estos efectos, estos experimentos sugieren que los mecanismos de la angiogénesis en el pez cebra y los humanos son probablemente similares.

B. Ácidos nucleicos

[0139] Para suministrar los ácidos nucleicos de los teleósteos, se estableció un sistema de microinyección. La microinyección de ADN, ARN y proteínas es un procedimiento bien establecido utilizado en una variedad de sistemas biológicos, incluyendo células individuales, embriones de rana, embriones de ratón y pez cebra. Westerfield, *supra*. En el pez cebra, se pueden cargar todas las células del embrión mediante la inyección de moléculas de interés en el vitelo de 1-16 embriones de etapa celular. Ver Westerfield, *supra*. Usando estos procedimientos estándar, varios cientos de embriones se pueden cargar en un período de dos horas.

3. Evaluación de la tecnología de carga celular biolística

[0140] La tecnología de carga celular biolística utiliza partículas recubiertas para introducir moléculas de interés en tejidos y órganos de un animal. En esta técnica, las partículas recubiertas con la molécula biológica son inyectadas de manera "biolística" en la célula o tejido de interés del animal con una pistola de alta presión. Esta técnica se ha utilizado con éxito para carga células de cultivo principales, así como embriones de ratón completos con grandes construcciones de plásmido de ADN. Chow et al., Amer. J. Pathol. 2 (6):1667-1679 (1998).

[0141] Con los procedimientos de la invención, la carga de las células biolísticas se puede utilizar como una alternativa a las técnicas de microinyección para inyectar compuestos en animales, tales como, por ejemplo, adultos, larvas y embriones de teleósteos. El ADN puede ser administrado a nivel regional al teleósteo (por ejemplo, introducido en los lugares específicos en el embrión de teleósteo), como la cola o en la superficie dorsal del vitelo, antes, después o en el momento de que comienza la angiogénesis.

4. Establecimiento de parámetros para cuantificar y caracterizar los efectos de los compuestos sobre la actividad de la angiogénesis y la toxicidad de las células endoteliales

[0142] Para determinar si un compuesto en particular es de potencial uso terapéutico o profiláctico, una serie de parámetros adicionales, incluyendo la ventana terapéutica y la ventana efectiva se pueden determinar.

A. Ventana terapéutica

[0143] La ventana terapéutica (TW) es la relación entre la concentración efectiva media (CE50) y la concentración letal media (LC50) (es decir, LC50/CE50). LC50 se determina mediante la administración de diluciones seriadas de un agente y determinando qué proporción de los peces teleósteos mueren en cada dilución. LC50 es la concentración necesaria para causar la mortalidad en el 50% de los teleósteos. Los agentes que presentan una alta ventana terapéutica (LC50/CE50), por ejemplo, 100 ó 1.000, son buenos candidatos potenciales a los medicamentos debido a que la toxicidad en la concentración terapéutica es baja. Las concentraciones de agentes suelen oscilar entre picomolar a milimolar.

B. Ventana efectiva

[0144] La ventana efectiva (EW) identifica el momento de la angiogénesis en la que un compuesto es eficaz. Esto se determina mediante la exposición de los embriones a EC50 de un compuesto en las diferentes etapas de la angiogénesis, comenzando con la etapa de somitas 12, cuando los angioblastos primero se detectan, a través de la etapa de 72 horas, cuando la vascularización en el embrión se ha completado.

[0145] En nuestros estudios preliminares, se identificaron una serie de compuestos que son tóxicos en concentraciones diferentes. Es posible que estos compuestos sean extremadamente potentes, y que sólo bajas (picomolar) concentraciones de estos compuestos tengan efecto en la angiogénesis. Este problema puede ser abordado mediante el cribado de compuestos para efectos angiogénicos en concentraciones muy por debajo de la concentración a la que se induce toxicidad.

C. Cuantificación del crecimiento de los vasos

[0146] Aunque la comparación visual de un embrión tratado con un compuesto de interés con un embrión sin tratamiento (control) es un medio eficaz para identificar los cambios en la arquitectura de los vasos relacionados con la angiogénesis, no permite una evaluación cuantitativa. Como alternativa o como complemento a la comparación visual, un análisis de imágenes puede ser utilizado para cuantificar y estandarizar el análisis. Existen una serie de paquetes de software disponibles en el mercado (por ejemplo, Image-Pro Plus™, Media Cybernetics; WSR Image Analysis System, WindSword Software Research; MetaMorph®, Universal Imaging Corp.) que permiten mediciones de la distancia y de las área de las dimensiones de los vasos y la distribución - los parámetros utilizados para el análisis visual.

D. Evaluación de los marcadores adicionales para la caracterización de la actividad angiogénica

[0147] Los marcadores de anticuerpos que etiquetan las proteínas de señalización implicadas en la formación de los vasos angiogénicos en el pez cebra, incluyendo VEGF y Ang1 y 2 (Hanahan, Science 277 (5322):48-50 (1997)), ayudarían en la identificación de compuestos que son agonistas o antagonistas de las moléculas de señalización que guían el desarrollo y el patrón de los vasos. Una serie de marcadores de anticuerpos se han identificado en ratones y están disponibles comercialmente (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Estos marcadores pueden ser probados en los teleósteos con los protocolos estándar de tinción de anticuerpos. Westerfield, supra. Los anticuerpos pueden ser usados en lugar de las sondas de ARN para simplificar el procedimiento de ensayo.

[0148] En pocas palabras, los embriones son fijos durante 2 horas a temperatura ambiente. Los embriones se lavan dos veces en tampón fosfato salino con Tween (PBT) y se permeabilizan con acetona de tratamiento a -20°C durante 7 minutos. Los embriones se rehidratan y se tratan con una solución de bloqueo (suero de cabra al 2%, albúmina de suero bovino (BSA) al 1% en PBT) durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, los embriones se sumergen en solución de bloqueo que contiene el anticuerpo primario durante la noche a 4°C. Los

embriones se lavaron 5 veces en PBT con BSA al 1%. Los embriones se sumergen en solución de bloqueo que contiene un segundo anticuerpo conjugado con HRP durante 4 horas a temperatura ambiente. Los embriones son lavados y teñidos por inmersión en una solución de DAB (1 mg de diaminobencidina, 1 ml 0,1 M tampón PO₄, 1 ml dH₂O y 20 µl de DMSO) durante 15 minutos. H₂O₂ se añade a la solución para el desarrollo del color. La reacción se detiene mediante la adición de PBT.

E. Ensayos para compuestos que inducen toxicidad de las células endoteliales

[0149] Aunque la estrategia de bloqueo de la formación de nuevos vasos tiene un importante potencial para la terapia contra el cáncer, una estrategia alternativa consiste en destruir los vasos que ya están presentes en el tumor. Con esta estrategia, se administra un compuesto a los teleosteos después de la formación de los vasos, no antes de la formación de los vasos. No se sabe cuánto tiempo persisten los compuestos en el medio que contiene embriones de teleosteos; se asume que los efectos sobre la formación de los vasos sanguíneos se producen relativamente pronto después de la administración del compuesto. Para identificar los compuestos que tienen efectos tóxicos sobre los vasos sanguíneos después de la formación, se administraron compuestos a los embriones de pez cebra a las 60 horas de desarrollo, cuando los vasos subintestinales estaban bien establecidos. A continuación, se probaron los embriones a las 72 y 84 horas de desarrollo. Los compuestos fueron cribados para aquellos que causaron una pérdida de la tinción de los vasos subintestinales, tal como se describió anteriormente.

F. Evaluación del uso de líneas de peces mutantes

[0150] Los estudios sugieren que puede ser difícil inducir el crecimiento de vasos adicionales en un sistema animal normal. Por ejemplo, hay evidencia de esto en el modelo murino de isquemia (Couffignal et al., Amer. J. Pathol. 2 (6):1667-1679 (1998)). Este problema puede ser evitado mediante la realización cribados de animales en los que ha sido deteriorado el desarrollo de los vasos. Unas pocas mutaciones genéticas existen en el pez cebra que interrumpen la formación de los vasos. Ejemplos de estas mutaciones son los siguientes: 1) parálisis, defecto hereditario del patrón vascular no localizado en el pez cebra (Weinstein et al, Centro de Investigación Cardiovascular, Hospital General de Massachusetts, Charleston, MA (1998)), en el que la formación de los vasos es normal en la región de la cabeza y ausente en la cola en los primeros 3-4 días de desarrollo, y después de aproximadamente cuatro días, los vasos colaterales comienzan a aparecer en la cola, 2) cloche (Fouquet et al, supra, Thompson et al, Dev Biol. 197 (2):248-49 (1998)), en cuyo desarrollo se ven afectados los angioblastos, y 3) no tiene cola y cabeza flotante (Fouquet et al, supra), mutantes notocordios, en los que la formación de los vasos mayores se bloquea. La utilidad de estas y otras líneas mutantes son fácilmente evaluadas mediante el uso de los procedimientos para cribar compuestos para la actividad angiogénica que se describe en este documento. En la actualidad, no hay mutaciones conocidas que impliquen una aceleración en el crecimiento de los vasos en el pez cebra.

G. Evaluación de los efectos de los compuestos angiogénicos/anti-angiogénicos en los sistemas de órganos

[0151] Los efectos de un compuesto de sistemas de órganos diferentes del sistema vascular (por ejemplo, riñón, corazón, etc.) se puede determinar mediante el uso de los procedimientos de detección descritos en este documento. La capacidad de tomar tales decisiones es significativa, porque en la evaluación del valor terapéutico potencial de los compuestos identificados usando los procedimientos de cribado de compuestos para la actividad de la angiogénesis, es importante también para identificar los efectos adversos, incluidos los efectos adversos sobre otros órganos y sistemas. El modelo de teleosteos es ideal para este propósito debido a que muchos de sus órganos se pueden visualizar en el embrión del teleosteo transparente por microscopía de luz (por ejemplo, el corazón y el CNS); alternativamente, una serie de órganos de los embriones de teleosteos se pueden identificar mediante técnicas de tinción sencillas (por ejemplo, hígado, intestinos, corazón y riñón). Por ejemplo, la función cardíaca y la viabilidad del hígado se pueden probar. Como el corazón está conectado directamente a la vasculatura y como el corazón y los vasos comparten algunos de los mismos tipos de células, el corazón es un posible objetivo secundario de los compuestos que afectan a la actividad de la angiogénesis. Como el hígado es el sitio de acumulación y metabolismo de muchos compuestos, especialmente las toxinas, es un indicador de la toxicidad de los compuestos y los productos de degradación.

[0152] Como se describió anteriormente, en nuestros estudios iniciales, se observó que un pequeño número de compuestos afectaron el ritmo cardíaco del embrión de pez cebra. Con seis compuestos se observó que el corazón del pez cebra latió a aproximadamente 1-2 latido(s) por segundo en lugar de los 4-5 latidos normales por segundo. Para determinar si un compuesto particular afecta el desarrollo del corazón de los teleosteos, o si actuó como un antagonista de los mecanismos de conductividad, se administró el compuesto de interés a un embrión de pez cebra a las 72 horas de desarrollo, cuando el corazón funciona y el sistema vascular está presente. Los embriones fueron evaluados 2 horas después de la adición del compuesto para los efectos inmediatos sobre la frecuencia cardíaca y la contractilidad y a las 24 horas para los efectos que podrían requerir nuevo gen o la expresión de proteínas. Si un compuesto actúa como un antagonista directo en cualquiera de los mecanismos de conducción o la contracción del corazón del pez cebra, su administración al pez cebra en cualquier momento es probable que muestre un efecto. Sin embargo, si un compuesto afecta el desarrollo del corazón del pez cebra, su presencia no debe mostrar ningún efecto en la fase posterior de desarrollo.

[0153] Además de examinar la frecuencia cardíaca y la contractilidad, también se examinó la estructura del

corazón, tanto mediante inspección visual (Stainier et al., Development 123:285-92 (1996)) y mediante la tinción del corazón con anticuerpos contra la tropomiosina y cadena pesada de miosina cardíaca (Stainier y Fishman, Trends Cardiovasc. Med. 4:207-212 (1994), lo que permitió la identificación de la aurícula y el ventrículo - las dos cámaras del corazón de los peces. En pocas palabras, los embriones fueron fijados durante 2 horas a temperatura ambiente. Los embriones fueron lavados dos veces en PBT con Tween y se permeabilizaron con acetona de tratamiento a -20°C durante 7 minutos. Los embriones fueron rehidratados y luego tratados con una solución de bloqueo (suero de cabra al 2%, suero bovino de albúmina (BSA) al 1% en PBT) durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, los embriones se sumergen en la solución de bloqueo que contiene el anticuerpo primario durante la noche a 4°C. Los embriones se lavaron 5 veces en PBT con BSA al 1%. Los embriones fueron expuestos posteriormente a los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados fluorescentes para la detección. Los embriones fueron analizados utilizando un microscopio de epifluorescencia. Este procedimiento utiliza un determinado medio de detección; se pueden utilizar reactivos secundarios alternativos y procedimientos de visualización (o detección), incluyendo, por ejemplo, procedimientos cromogénicos, radiológicos u otros.

III. PROCEDIMIENTOS DE CRIBADO DE UN AGENTE PARA UN EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA MUERTE CELULAR

A. Muerte celular

[0154] La muerte de las células de los organismos multicelulares puede resultar de procesos naturales o causas externas no fisiológicas. Hay dos tipos de muerte celular conocidos: la necrosis y la apoptosis. La necrosis es la muerte patológica de las células vivas que resulta de una lesión aguda no fisiológica a las células. Hetts, J. Amer. Med. Assoc. 279 (4):300-07 (1998). La necrosis puede ser consecuencia de la exposición de una célula a una serie de condiciones diferentes, incluyendo toxinas, hipoxia severa, insulto masivo o lesiones físicas, o condiciones del agotamiento de la adenosina 5'-trifosfato (ATP). *Id.* La necrosis se produce, por ejemplo, en el centro de tejido infartado en un accidente cerebrovascular isquémico o en el centro de la acción de la toxina. *Id.* Las células necróticas se hinchan y se lisan, liberando así su contenido nuclear en las regiones intercelulares circundantes y provocando una respuesta inflamatoria. *Id.* Significativamente, sin embargo, la necrosis no es el único mecanismo por el cual las células mueren.

[0155] La apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso fisiológico de origen natural que juega un papel importante en los tejidos durante el desarrollo del modelo. Kerr et al., Br. J. Cancer 26:239-257 (1972), Clarke, Anat. Embryol. 181:195-213 (1990). La apoptosis asegura que se mantiene un equilibrio entre la proliferación y la diferenciación celular en casi todos los tejidos de auto-renovación de los organismos multicelulares. La apoptosis permite la eliminación de las células que, por ejemplo, ya no son necesarias, se producen en exceso, han sufrido daños o se han desarrollado incorrectamente. Existen numerosos tipos de células que se someten a la muerte celular a través de los procesos de apoptosis. Hetts, J. Amer. Med. Assoc. 279 (4):300-307 (1998). Las células apoptóticas sufren una serie de cambios característicos, incluyendo condensación de la cromatina, fragmentación nuclear y vesiculación citoplasmática. Liepins y Bustamante, Scanning Microsc. 8:631-641, (1994). Este mecanismo de muerte celular programada es preciso y predecible, y las etapas y los genes que regulan la muerte celular están altamente conservados entre los animales multicelulares.

[0156] La apoptosis parece estar dirigida por las propias células que mueren, y durante el desarrollo, está involucrado en el mantenimiento del número de células y el tipo apropiado de células en un órgano o tejido dado. Algunos eventos apoptóticos se cree que son regulados mediante la limitación de la cantidad de factores de crecimiento o la supervivencia. También se puede activar en respuesta a estímulos externos, como, por ejemplo, radiación, hipermia, retirada de hormonas, reacciones inmunes, radiación, quimioterapias, temperaturas extremas, privación del factor de crecimiento, e infección por algún virus. Thompson, Science 267:1456-1462 (1995).

[0157] La regulación anormal de la apoptosis se ha implicado en la aparición y progresión de una amplia gama de enfermedades que resultan de la muerte celular inadecuada o la inhibición de la muerte celular. La desregulación de la apoptosis se ha implicado, por ejemplo, en algunos tipos de células de cáncer que sobreviven por períodos más largos que las células normales correspondientes. Se cree que la supresión o el fracaso del mecanismo de la apoptosis permite a ciertas células cancerosas someterse a nuevas mutaciones que conducen a un estado de transformación o canceroso. Hetts, J. Amer. Med. Assoc. 279 (4):300-307 (1998). La apoptosis sin control también se ha implicado en otros trastornos, incluyendo enfermedades neurodegenerativas, linfoproliferación, enfermedades autoinmunes, y en enfermedades del corazón y renales. *Id.*

[0158] Además, muchos enfoques terapéuticos para las enfermedades (por ejemplo, cáncer, enfermedades del corazón y enfermedades neurodegenerativas), incluyendo varias quimioterapias y el trasplante de órganos, se ha demostrado que inducen la apoptosis en las células normales. *Id.*

[0159] La inhibición indiscriminada de la apoptosis puede conducir a la hiperplasia generalizada, y la promoción inapropiada de la apoptosis puede conducir a la degeneración de los tejidos deseados, lo que subraya la necesidad de más ensayos precisos para estudiar la muerte celular. Múltiples vías de acceso a la apoptosis significa que son posibles diferentes enfoques terapéuticos para el tratamiento de la regulación de apoptosis anormal, lo que demuestra la necesidad de ensayos para seleccionar compuestos por su capacidad para provocar o suprimir la muerte celular.

[0160] La comprensión de los mecanismos de la actividad de muerte celular, incluyendo la apoptosis, facilitaría el desarrollo de compuestos terapéuticos que estimulan, activan, o inician la muerte celular, o, alternativamente, suprimir, inhibir o bloquear la muerte celular. Por ejemplo, el descubrimiento de las proteínas de señalización y sus correspondientes receptores presenta la oportunidad para el desarrollo de herramientas para la corrección de la maquinaria celular apoptótica cuando falla o el aprovechamiento de su potencial para la eliminación de las células. Debido a que la regulación anormal de la apoptosis se ha implicado en la aparición y progresión de una amplia gama de enfermedades, muchas enfermedades pueden ahora ser clasificadas en función de si están asociadas con la apoptosis demasiado o demasiado poco. En particular, una serie de enfoques destinados a la terapia del cáncer están actualmente bajo investigación, ya que se sabe que las células tumorales proliferan cuando el motor de la apoptosis no funciona. Los procedimientos potenciales de reparación incluyen encontrar sustancias químicas que marquen los receptores para restaurar la función de la apoptosis en células tumorales, y la inducción de la apoptosis en el vaso sanguíneo que desarrolla un tumor.

[0161] Una mejor comprensión de las vías de apoptosis molecular también puede estimular el desarrollo de nuevas terapias no farmacológicas. Por ejemplo, un adenovirus que sólo es capaz de replicar y matar a las células deficientes en p53 se encuentra actualmente en Fase I de ensayos clínicos como posible agente antitumoral que debe matar sólo células de tumores deficientes p53, dejando las células normales no afectadas. Un compuesto que limite el daño coronario si se inyecta después de un ataque al corazón también se está investigando, lo que subraya el potencial para el desarrollo de técnicas moleculares que utilizan pequeñas moléculas que inhiben e inducen la apoptosis selectivamente. Una mejor comprensión de los procesos fisiológicos de la apoptosis a nivel molecular podría dar una idea de patogénesis de la enfermedad y abrir nuevas vías para el desarrollo de herramientas diagnósticas, pronósticas y terapéuticas.

[0162] La genética y los mecanismos moleculares de la apoptosis se caracterizaron en la década de 1980 y a principios de 1990 en estudios con el gusano nematodo *C. elegans*. Aunque el nematodo tiene muchas ventajas como sistema modelo, incluyendo la conservación evolutiva de gran parte de la vía de señalización implicada en la apoptosis (véase, por ejemplo, Steller, Science 267:1445-49 (1995)), no es el modelo óptimo para la comprensión de la actividad de los vertebrados, la muerte celular y los estados de enfermedad. Los vertebrados son mucho más complejos y tienen múltiples vías de apoptosis que comprenden muchas moléculas de señalización. Actualmente no hay ensayos *in vivo* rápidos para la detección de un compuesto para su efecto sobre la actividad de la muerte celular, tal como la apoptosis, *in vivo* en un sistema de vertebrados. Por consiguiente, sería deseable proporcionar un rápido procedimiento de cribado *in vivo* de un compuesto para sus efectos sobre la actividad de la muerte celular, incluyendo la apoptosis y la necrosis, en un sistema de vertebrados.

[0163] En la actualidad hay dos procedimientos principales de detección de la actividad de la muerte celular en huéspedes vertebrados. El primer enfoque utiliza técnicas estándar de cultivo de células y típicamente se basa en lectores de microplacas estándar para detectar la muerte de las células cultivadas a partir de un organismo. Una gran desventaja del formato de ensayo de cultivo celular es que no permite un análisis de los efectos de un compuesto en tipos de células que no han sido cultivadas (es decir, otros tipos de células) o en uno o más órganos o tejidos o un huésped completo intacto *in vivo*. Además, este formato de ensayo no permite la monitorización simultánea de las actividades de muerte celular en varios tejidos, órganos o sistemas de un huésped vivo o la monitorización a lo largo del tiempo.

[0164] Un segundo enfoque para detectar la actividad de la muerte celular utiliza una técnica de tinción histoquímica, designada de etiquetado final de nucleótidos de desoxiuridina terminal (TUNEL) para detectar las células muertas o moribundas (por ejemplo, las células apoptóticas) en tejidos seccionados de embriones de vertebrados. Gavrieli et al., J. Cell. Biol. 119:493-501 (1992). Desafortunadamente, con este enfoque, sólo un solo punto de tiempo en el ciclo de la vida del huésped puede ser examinado, no se puede monitorizar la muerte de células en diferentes tejidos u órganos a lo largo de un período de tiempo. Tampoco pueden monitorizarse los efectos secundarios debidos a un compuesto administrado de manera simultánea o a lo largo del tiempo. Como muchas enfermedades se producen por etapas, la capacidad de examinar los cambios en el patrón de la actividad de la muerte celular causada por un compuesto, la duración de los efectos directos y secundarios de los compuestos de múltiples tejidos, representaría una mejora significativa sobre los procedimientos actuales.

[0165] Los productos genéticos que regulan la actividad de la muerte celular, incluyendo la apoptosis, son excelentes objetivos para la intervención terapéutica en el alivio de muchos procesos de la enfermedad. En la actualidad existen pocos productos de terapia génica. También sería deseable proporcionar un procedimiento de detección de un compuesto para su posible efecto terapéutico sobre la actividad de la muerte celular. Tales procedimientos serían beneficiosos en el alivio de las enfermedades resultantes de procesos de muerte celular anormal, incluidos los derivados de la muerte celular inadecuada o la inhibición de la muerte celular (por ejemplo, la desregulación, la apoptosis).

B. Procedimientos de agentes de cribado para la actividad en la muerte celular

[0166] La presente invención proporciona procedimientos de cribado de un agente para un efecto sobre la actividad de la muerte celular en un animal vertebrado, tal como un teleosteo, *in vivo* o *in vitro* en las células del animal. La actividad de la muerte celular es la habilidad o la capacidad de un agente para mejorar, estimular, inhibir o bloquear

la muerte celular en un animal, tejido, órgano o célula en respuesta a la administración de un agente. La actividad de la muerte celular se evalúa en relación a los teleósteos de control contemporáneos y/o históricos (o tejidos, órganos o células de los mismos) a los que el agente no se ha administrado. Estos procedimientos son útiles para la detección de un agente para su capacidad para activar, mejorar, suprimir o eliminar los procesos apoptóticos o necróticos. Los agentes identificados se pueden utilizar potencialmente en el tratamiento terapéutico o profiláctico de las enfermedades que resultan de procesos de muerte celular anormal o enfermedades que podrían beneficiarse de la eliminación o la muerte controlada de las células o tejidos específicos.

[0167] Algunos de estos procedimientos comprenden la administración del agente a un teleosteo completo *in vivo* y la detección de una respuesta en el teleosteo que indique un efecto sobre la actividad de la muerte celular. Otros procedimientos incluyen la administración del agente *in vitro* a un cultivo de células de un teleosteo y la detección de una respuesta en las células que indiquen un efecto sobre la actividad de la muerte celular. En algunos procedimientos, la respuesta detectada es un incremento o el inicio de la actividad de la muerte celular. En otros procedimientos, la respuesta detectada es una disminución o supresión de la actividad de la muerte celular. En algunos procedimientos, la respuesta es un aumento o disminución de la actividad apoptótica. Un efecto sobre la actividad apoptótica puede medirse mediante la detección de una respuesta que indique tal efecto; la respuesta puede ser, por ejemplo, un aumento o activación de la apoptosis o la disminución o supresión de la apoptosis. Un aumento de la actividad apoptótica generalmente comprende un aumento en la muerte de las células en un tejido u órgano del animal.

[0168] Típicamente, el animal es un teleosteo, tal como un pez cebra. Usualmente, el teleosteo es transparente. El teleosteo puede ser en forma embrionaria, larval o adulta.

[0169] Alternativamente, un agente puede ser cribado para un efecto sobre la actividad necrótica *in vivo* en un teleosteo mediante la administración del agente al teleosteo *in vivo* y la detección de una respuesta en el teleosteo que indica un efecto sobre la actividad necrótica. Un agente también puede ser cribado para un efecto sobre la actividad necrótica *in vitro* mediante la administración del agente *in vitro* a las células cultivadas de un teleosteo y detectar en las células que indican un efecto sobre la actividad necrótica. En ambos procedimientos, la respuesta puede ser un aumento o una disminución de la actividad necrótica.

[0170] El efecto de un agente particular en el teleosteo entero intacto y/o uno o más órganos, tejidos o sistemas del teleosteo (por ejemplo, el sistema cardiovascular, el sistema intestinal, y la musculatura) se puede medir *in vivo* o *in vitro* en células del teleosteo y, si se desea, durante un período de tiempo y/o en intervalos de tiempo seleccionados. Las respuestas en las combinaciones de los órganos y/o los tejidos se pueden detectar simultáneamente o por separado; estos análisis se pueden realizar a lo largo del tiempo en intervalos de tiempo predeterminados. Estos procedimientos también se pueden utilizar con células aisladas o lisados celulares.

[0171] La actividad de la muerte celular puede detectarse *in vivo* o *in vitro* mediante el uso de al menos una de una variedad de técnicas, incluyendo, por ejemplo, microscopía de fluorescencia, microscopía óptica, análisis de imagen digital, o técnicas de lector de microplacas estándar (colorimetría, fluorimetría, incluyendo fluorimetría resuelta en el tiempo, y quimioluminiscencia), tinción de anticuerpos de proteínas, cambios en los niveles de la enzima o actividades enzimáticas en el teleosteo completo, o tejidos, órganos o células del teleosteo, y cambios en la distribución de las proteínas temporal y espacialmente en el animal. La respuesta también puede ser objeto de discriminación y/o analizarse mediante el uso de software de reconocimiento de patrones. Así, por ejemplo, un aumento en el tejido necrótico o apoptótico puede ser analizado en un pez cebra mediante el uso de tales técnicas.

[0172] Las técnicas de detección basadas en fluorescencia y microscopía de fluorescencia también se pueden utilizar para detectar el efecto de un agente en la actividad de la muerte celular en un animal, tal como un teleosteo. Por ejemplo, los teleosteos se pueden teñir con una membrana impermeante, tinte fluorescente de tinción nuclear que permite la detección de la actividad de la muerte celular (por ejemplo, apoptosis o necrosis). Se pueden utilizar una gran variedad de tintes fluorescentes. Los tintes preferidos incluyen los de la familia de tinte de cianina asimétrica (tal como los tintes de quinolina, por ejemplo, tintes de benzotiazolina-4-quinolina (Molecular Probes)), incluidos los derivados, análogos, y las formas sustituidas o no sustituidas de los mismos. Estos tintes se describen en general en la patente US No. 5.658.751. Algunos de estos tintes están disponibles comercialmente.

[0173] Estos tintes, incluyendo los tintes de cianina monomérica (tal como benzotiazolina-4-quinolina), no pueden atravesar las membranas de las células intactas de embriones vivos. Sin embargo, estos tintes pueden entrar en células muertas o moribundas cuyas membranas se han convertido en discontinuas o interrumpidas (una característica de las células en proceso de muerte celular, Liepins y Bustamante, Scanning Microsc. 8:631-41 (1994)). En particular, la vesiculación citoplasmática y otras propiedades en la característica de la membrana de una célula muerta, moribunda, o apoptótica permiten que estos tintes entren en la célula.

[0174] Una vez que pasan a través de la membrana celular, los tintes de cianina monomérica (por ejemplo, benzotiazolina-4-quinolina) se intercalan en el ADN de las células muertas o moribundas. La cromatina densa y la fragmentación nuclear proporcionan un ambiente ideal para la intercalación de tinte y la amplificación de la señal. Singer, Biotechnol. Intl. 1:267-276 (1997). Al intercalarse en el ADN, el tinte se vuelve intensamente fluorescente, lo que permite la rápida detección de las células marcadas con microscopía de fluorescencia simple. En particular, cuando se concentra en el ADN, la señal fluorescente del tinte de benzotiazolina-4-quinolina se amplifica hasta 400 veces.

Serbedzija et al., J. Neurobiol. 31 (3):275-282 (1996). La magnitud de la señal sirve como medida del número de células apoptóticas o necróticas.

[0175] En particular, los procedimientos *in vivo* de los agentes de detección de la actividad de la muerte celular de la presente invención proporcionan una detección más sensible y precisa y la medición de la muerte celular en embriones enteros *in vivo* que la permitida por los enfoques existentes. Otros marcadores fluorescentes de la muerte celular, tal como naranja de acridina, pasan a través de las membranas de las células de embriones vivos mucho más fácilmente y son fluorescentes bajo una variedad de condiciones de los tintes de cianina monomérica, tal como tintes de benzotiazolina-4-quinolina. Por ejemplo, la naranja de acridina fluorescente cuando se une a los ácidos nucleicos y cuando está localizada en compartimentos subcelulares, tal como lisozimas. También se ha informado de que la naranja de acridina no se une con eficacia con el ADN en determinadas circunstancias, incluida la compactación de la cromatina que a veces se asocia con la apoptosis. Por lo tanto, la naranja de acridina y tintes similares no proporcionan un marcador tan específico de la muerte celular como un tinte de benzotiazolina-4-quinolina.

[0176] Los tintes de cianina monomérica (por ejemplo, tintes de benzotiazolina-4-quinolina) también proporcionan una mayor señal de fondo cuando se unen al ácido nucleico que los otros marcadores fluorescentes de la muerte celular, tal como la naranja de acridina. Además, los espectros de emisión de fluorescencia de los tintes de benzotiazolina-4-quinolina suelen ser más estrechos (es decir, la emisión se produce en una banda estrecha de longitudes de onda de emisión) que son los espectros de emisión de otras etiquetas de fluorescencia, como, por ejemplo, naranja de acridina, que tiene un espectro de fluorescencia de emisión muy amplio. El espectro de emisión característico de los tintes de cianina monomérica permite el uso de dos o más etiquetas adicionales de fluorescencia de forma simultánea junto con el tinte de quinolina, lo que permite la caracterización de diversos tipos de eventos fisiológicos en órganos o tejidos iguales o diferentes. Un amplio espectro de emisión (por ejemplo, naranja de acridina) limita severamente la habilidad de usar múltiples etiquetas fluorescentes para los procedimientos de detección descritos en este documento debido a la superposición entre los espectros de emisión de fluorescencia de las etiquetas. Por lo tanto, con los procedimientos de la invención descritos en este documento, se puede utilizar más de un tinte fluorescente en conjunto para la monitorización de múltiples fenómenos celulares y/o moleculares en respuesta a un agente administrado a los animales *in vivo* de forma simultánea en el tiempo. Los tintes pueden ser seleccionados para tener bandas de emisión que coinciden con los conjuntos de filtros disponibles en el mercado como el de fluoresceína o para la detección de múltiples fluoróforos con la excitación y varias bandas de emisión.

[0177] Además, en contraste con otros marcadores fluorescentes de la muerte celular, los tintes de benzotiazolina-4-quinolina no son tóxicos, por lo que los efectos apoptóticos o necróticos en un teleosteo vivo al que se la ha administrado el tinte se pueden controlar durante un período de tiempo significativo, sin riesgo de que los teleosteos se verán afectados negativamente por el tinte. Por el contrario, los ensayos con otros tipos de marcadores de la muerte celular requieren que el huésped sea sacrificado y fijado (*por ejemplo*, etiquetado TUNEL).

[0178] El tinte fluorescente se suele administrar al teleosteo mediante la adición de la tinta al medio que contiene los teleosteos. Alternativamente, el tinte puede ser inyectado directamente en el teleosteo. El tinte se administra típicamente antes de la administración del agente para un cribado para la actividad de muerte celular. Este procedimiento proporciona resultados superiores respecto a los enfoques existentes, ya que hemos encontrado que si el tinte se añade después de que la apoptosis haya sido inducida, el tinte es menos eficaz en el etiquetado de las células muertas o moribundas. Uno de los mecanismos de la apoptosis (por ejemplo, la polimerización de los componentes de las membranas intracelulares y la membrana plasmática) puede hacer que sea difícil o imposible que el tinte entre en la célula. Como resultado, una célula apoptótica no puede ser etiquetada. Al aplicar el tinte antes de la aplicación del agente, se evita este problema. La emisión de fluorescencia de los tintes se controla mediante el uso de técnicas fluorométricas, incluida la inspección visual, cámaras CCD, cámaras de vídeo, película fotográfica, o el uso de instrumentos actuales, tal como los dispositivos de escaneo láser, fluorómetros, fotodiodos, contadores cuánticos, contadores de fotones, lectores de placas, microscopios de epifluorescencia, microscopio de escaneado, microscopios confocales, o mediante amplificación de la señal, tal como un tubo fotomultiplicador.

[0179] A diferencia de otros tintes conocidos que implican procedimientos laboriosos de etiquetado (por ejemplo, el etiquetado TUNEL), los tintes de benzotiazolina-4-quinolina son particularmente adecuados para procedimientos automatizados de detección de alto rendimiento. La mayor relación señal-ruido inherente a estos tintes y nuestro procedimiento superior de administración del tinte antes de la administración del agente para su cribado para la apoptosis permite la adquisición automática de datos, la cuantificación más precisa de los datos recogidos (por ejemplo, imagen digital), y la posibilidad de extracción de características/segmentación de imágenes de los datos adquiridos. Estas características permiten la asignación de la señal de la apoptosis en las dimensiones de espacio/tiempo que se pueden correlacionar con las coordenadas del mapa de destino del mapa de destino del teleosteo específico. Dicha información permite una mayor caracterización de los agentes cribados.

[0180] Tal como se señaló anteriormente, la actividad de la muerte celular (por ejemplo, apoptosis y necrosis) también puede ser detectada mediante imagen digital. La imagen digital es una herramienta indispensable para la investigación biológica debido a varias ventajas en comparación con el ojo humano. La imagen digital implica la obtención de imágenes mediante un dispositivo de carga acoplada (CCD). La sensibilidad del detector de imagen superior le permite a uno de visualizar objetos de muy poca luz que no son detectables por el ojo humano. La sensibilidad espectral del ojo humano está limitada a 400-700 nm. Por el contrario, el rango de sensibilidad de los

detectores de imágenes de espectro es más amplio, y las señales de la gama de rayos X hasta el infrarrojo pueden ser detectadas.

[0181] La presente invención también proporciona procedimientos de cribado de un compuesto para su efecto sobre la actividad de la muerte celular *in vivo* en un teleosteo o *in vitro* en células del teleosteo a lo largo del tiempo. Tales procedimientos incluyen la administración del compuesto al teleosteo* *in vivo* o *in vitro* en células del mismo, detectando una respuesta en el teleosteo que indica un efecto sobre la actividad de la muerte celular y, además, la detección de una respuesta en la actividad de la muerte celular en el teleosteo después de un período predeterminado de tiempo o intervalo de tiempo. El período de tiempo, que es seleccionado por el practicante, suele ser suficiente para detectar la muerte celular que se produzca en presencia del compuesto. Además, múltiples puntos de tiempo pueden ser examinados para detectar cualquier actividad fisiológica pertinente. Algunos procedimientos comprenden, además, la detección de una respuesta en la actividad de la muerte celular (por ejemplo, la apoptosis) después de un segundo intervalo de tiempo predeterminado utilizando las técnicas de detección descritas en este documento. Estos procedimientos son útiles para evaluar el efecto de un agente (por ejemplo, compuesto químico, fármaco, agente ambiental, compuesto agrícola, toxina, cosmético farmacéutico, etc.) en los tejidos y órganos a lo largo del tiempo en el teleosteo intacto vivo.

[0182] En otro aspecto, la presente invención proporciona procedimientos de cribado de un agente para un efecto sobre la actividad de la muerte celular *in vivo* o *in vitro*, tal como se describió anteriormente, que comprenden, además, la detección de un aumento o disminución de la actividad de la muerte celular en más de un tejido u órgano del teleosteo simultáneamente. En algunos procedimientos, el aumento o la disminución de la actividad de la muerte celular se detecta de forma simultánea en más de un tejido u órgano en intervalos de tiempo predeterminados. El efecto de un compuesto particular en varias células, tejidos y órganos del embrión puede ser monitorizado y evaluado a lo largo del tiempo. La actividad de la muerte celular en varios tejidos u órganos se puede detectar mediante el uso de las técnicas de detección descritas a lo largo de esta memoria.

[0183] La presente invención también proporciona procedimientos automatizados de cribado de un compuesto para un efecto sobre la actividad de la muerte celular *in vivo* o *in vitro*. Los procedimientos de la invención pueden llevarse a cabo utilizando un formato de microplacas estándar, con uno o más teleosteos completos por pocillo de la microplaca. Este formato permite que los ensayos de cribado sean automatizados utilizando procedimientos estándar de microplacas y lectores de placas para detectar la muerte celular en el pez cebra en los pocillos. Con esta configuración, el efecto de un compuesto específico en un gran número de teleosteos se puede determinar con rapidez. Además, con ese formato, una gran variedad de compuestos pueden ser rápida y eficientemente cribados para sus respectivos efectos en las células de los teleosteos (*por ejemplo*, los embriones de teleosteos) contenidos en los pocillos. Los procedimientos de manipulación de muestras y de detección se pueden automatizar mediante la instrumentación disponible en el mercado y los sistemas de software para la aplicación rápida reproducible de tintes y compuestos y el cribado automático de los compuestos de interés.

[0184] Los teleosteos de control contemporáneos y/o históricos (que incluyen los tejidos, órganos o células de los teleosteos) que se utilizan con estos procedimientos pueden incluir aquellos en los que al menos un inhibidor de los mecanismos moleculares apoptóticos (incluyendo, *por ejemplo*, inhibidores conocidos o específicos de los mecanismos apoptóticos) se ha administrado al teleosteo (o tejidos, órganos o células del mismo) en etapas específicas de desarrollo, lo que genera un fenotipo particular, tal como la malformación del tejido (*por ejemplo*, la expansión del sistema nervioso central, malformaciones de la región del poro de la cloaca/anal, hiperproliferación de células de cualquier tejido). Los agentes pueden entonces ser examinados para la capacidad de inducir el mismo fenotipo o similar (*es decir*, la respuesta fenotípica). Con estos procedimientos, el agente se administra al teleosteo tal como se describió anteriormente; la respuesta fenotípica en el teleosteo se puede detectar visualmente por microscopía de luz, mediante una etiqueta fluorescente con tintes de cianina asimétrica mencionada anteriormente, o mediante el etiquetado con hibridación *in situ* o tinción de anticuerpos para determinados tipos de células. Usando estos tipos de controles, los agentes pueden ser examinados para la capacidad de "fenocopia" del efecto de la pérdida de la(s) función(es) molecular(es) o mecanismo(s) inducidos por el inhibidor apoptótico. La fenocopia en el teleosteo experimental (o tejidos, órganos o células del mismo) se refiere a la reproducción o imitación del mismo fenotipo o similares a los observados en el control.

[0185] La presente invención incluye procedimientos de cribado que se basan en la detección de actividad enzimática asociada con la apoptosis. En un aspecto, la invención proporciona procedimientos de cribado de un agente para la actividad apoptótica que comprenden la administración del agente a un teleosteo y la detección de una respuesta en el teleosteo que indique la actividad de la apoptosis mediante la detección de la actividad de una enzima (*por ejemplo*, la división de un sustrato de caspasa).

[0186] Las enzimas de caspasa, por ejemplo, son proteasas bien caracterizadas que funcionan como activadores, efectores, o mediadores en una serie de vías apoptóticas. El sustrato de la caspasa fluorogénica se pueden introducir en el teleosteo mediante una variedad de procedimientos, incluyendo, por ejemplo, mediante inyección en el teleosteo, disolviendo el sustrato en el medio que contiene el teleosteo. La manera de introducción del sustrato depende del tipo y de la naturaleza del diseño del sustrato reportero (por ejemplo, pequeña molécula, plásmido). El sustrato de caspasa fluorogénica se puede introducir en el momento o después, o, usualmente, antes de la administración del agente. La actividad de las caspasa (por ejemplo, la división del sustrato de caspasa) se puede medir mediante el uso

de, por ejemplo, procedimientos enzimáticos colorimétricos o fluorométricos disponibles en el mercado o mediante el uso de anticuerpos que detectan los sustratos divididos (por ejemplo, anticuerpo M30 CytoDEATH, Boehringer Mannheim). Los patrones específicos de la disgenesia del embrión resultantes de la inhibición durante eventos apoptóticos que se producen de forma natural. La inhibición de la actividad de la caspasa puede causar efectos morfológicos específicos, incluyendo la malformación del tejido. Estos procedimientos se pueden realizar *in vivo* utilizando teleosteos completos o *in vitro* usando células del teleosteo. Estos procedimientos son útiles para identificar los agentes que tienen actividad apoptótica que pueden tener potencial uso terapéutico o profiláctico para el tratamiento de una variedad de enfermedades, tal como el cáncer.

C. Agentes de cribado de la actividad de la muerte celular y/o actividad de la angiogénesis y/o actividad tóxica simultáneamente

[0187] Los procedimientos para la detección de los agentes de la actividad de muerte celular se pueden combinar con otros procedimientos de la presente invención, incluyendo procedimientos de detección de agentes para la actividad de la angiogénesis (Sección II) o la actividad tóxica (Sección IV). Debido a que los teleosteos son transparentes, es posible evaluar los efectos de la actividad de muerte celular, la actividad de la angiogénesis y/o los efectos tóxicos en teleosteos en respuesta a un agente al mismo tiempo. Las respuestas pueden ser monitorizadas en uno o más tejidos u órganos, y en intervalos de tiempo predeterminados.

[0188] Como se señaló anteriormente, estos procedimientos combinados son útiles en la evaluación de múltiples efectos de un agente, incluyendo las respuestas deseadas y no deseadas (por ejemplo, los efectos secundarios negativos) y los niveles de dosis del agente eficaz para promover una actividad sin la promoción de la otra. La capacidad de evaluar las múltiples actividades y las respuestas de un animal, debido a la administración de un agente es de gran beneficio en la identificación de compuestos con potencial terapéutico y la evaluación de sus efectos secundarios. La regulación de la apoptosis patológica, por ejemplo, se asocia con una amplia variedad de enfermedades humanas tales como cáncer, enfermedades del corazón, trastornos neurodegenerativos y enfermedades autoinmunes, enfermedades renales y virales inducidas. Esencialmente todas las células están a punto de suicidarse desde las primeras etapas de desarrollo. Por lo tanto, es imperativo que los fármacos tengan una diana exacta. Un equilibrio también debe ser alcanzado durante el tratamiento con fármacos con sólo un nivel insignificante de muerte celular y efectos tóxicos en los tejidos u órganos no específicos. Los procedimientos combinados de la invención son útiles para evaluar la especificidad y la amplitud de la muerte celular y los efectos nocivos y tóxicos de los fármacos potenciales en determinados órganos y tejidos o en el animal completo.

[0189] Una variedad de técnicas se pueden utilizar juntas o por separado para analizar las múltiples actividades/respuestas, incluyendo, por ejemplo, microscopía de fluorescencia, microscopía óptica, análisis de imagen digital, técnicas estándar de lector de microplacas (colorimetría, fluorimetría, incluyendo fluorimetría resulta con el tiempo, y quimioluminiscencia), análisis radiométrico, hibridación *in situ*, cambios en la actividad enzimática y niveles en el teleosteo completo, o tejidos, órganos o células del teleosteo, tinción de anticuerpos de proteínas específicas, cambios en la distribución de las proteínas temporal y espacialmente en el animal, etc.

[0190] En un aspecto, la presente invención proporciona procedimientos de cribado de un agente para un efecto sobre la actividad de la muerte celular *in vivo* o *in vitro* tal como se describe anteriormente, que comprenden, además, el cribado del agente para un aumento o disminución de la actividad tóxica mediante la detección de una respuesta del teleosteo que indica un aumento o disminución de la actividad tóxica. En otro aspecto, la invención proporciona procedimientos de cribado de un agente para un efecto sobre la actividad de la muerte celular *in vivo* o *in vitro* tal como se describe anteriormente, que comprenden, además, el cribado del agente para un aumento o disminución en la actividad de la angiogénesis mediante la detección de una respuesta en el teleosteo que indique un aumento o disminución de la actividad de la angiogénesis.

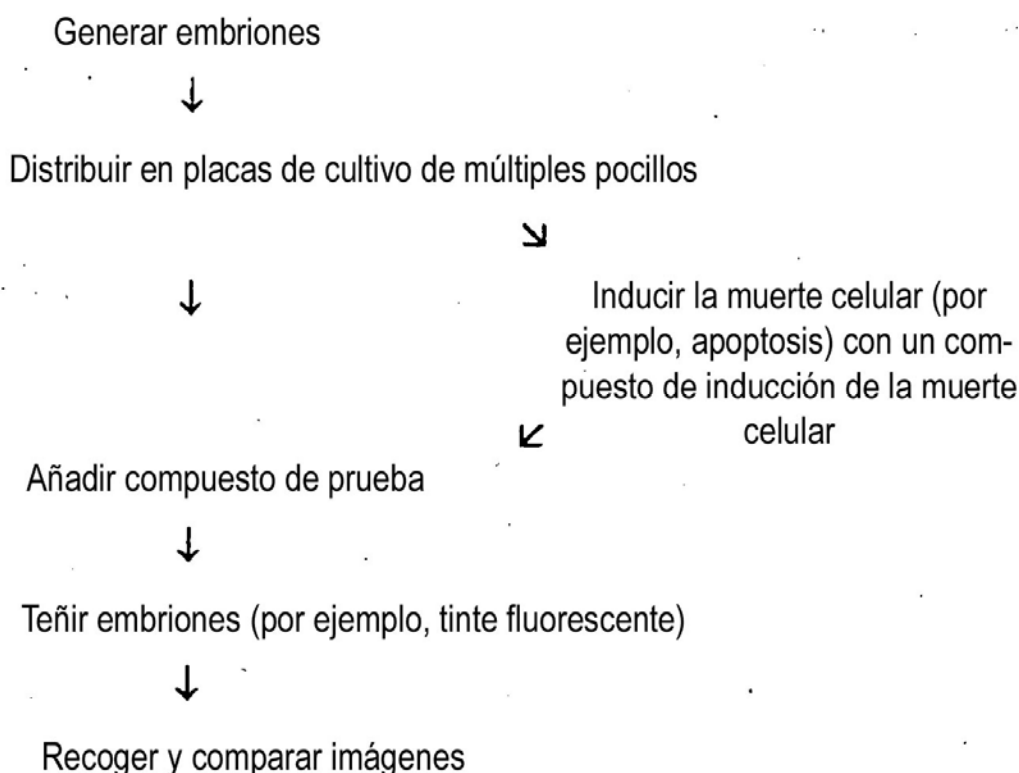
[0191] Con estos procedimientos de combinación, los teleosteos de control contemporáneos y/o históricos (o tejidos, órganos o células de los mismos) para los cribados de la actividad de la muerte celular pueden incluir los descritos anteriormente en los que ha habido al menos un inhibidor de los mecanismos moleculares apoptóticos que se administra al teleosteo (o tejidos, órganos o células del mismo) en etapas específicas de desarrollo, generando así un fenotipo particular. Los agentes pueden entonces ser examinados para la capacidad de inducir el mismo fenotipo o similar.

Ejemplos

1. Inducción de muerte celular en embriones de pez cebra

[0192] El tratamiento del pez cebra con ácido retinoico (RA, ácido de vitamina A) conduce a un aumento de la apoptosis en varios tejidos en desarrollo, incluyendo el tubo neural. Ellies et al., Mech. Dev. 61:23-36 (1997). El ácido retinoico es conocido por regular la expresión de la familia de genes Hox. Los miembros de esta familia de genes se ha demostrado que confieren identidad posicional a las células durante el desarrollo. Hunt et al., Nature 353:861-864 (1991). La apoptosis inducida con ácido retinoico puede ser el resultado de un cambio de identidad de una célula, o un efecto directo sobre la vía de la apoptosis. En cualquier caso, la aplicación de ácido retinoico es diferentes etapas de desarrollo lleva a los patrones característicos de la muerte celular (véase, por ejemplo, las figuras 10A-10B).

- 5 **[0193]** La apoptosis normal se produce en el embrión de pez cebra durante el período de la morfogénesis completa de 72 horas; sin embargo, altos niveles de apoptosis puede ser inducidos en el embrión de 24 horas mediante la administración de ácido retinoico al embrión. En los procedimientos de la presente invención, el ácido retinoico se utiliza para generar un patrón reproducible de la muerte celular para la optimización del ensayo. Donde la actividad de muerte celular implica la apoptosis, los ensayos de la presente invención pueden incluir una comparación de los efectos de la apoptosis inducida por el ácido retinoico en embriones de pez cebra en vivo (es decir, de control) con los efectos de un compuesto de ensayo en embriones de pez cebra en vivo. La precisión de estos ensayos se puede confirmar mediante la realización de la prueba TUNEL (descrita anteriormente) en embriones de pez cebra de la misma.
- 10 **[0194]** Un procedimiento de cribado de un compuesto de prueba para un efecto sobre la actividad de la muerte celular (por ejemplo, la apoptosis o necrosis) *in vivo* en los embriones de vertebrados se muestra a continuación:



- [0195]** Este procedimiento puede ser fácilmente automatizado utilizando el software conocido automatizado y sistemas de instrumentación.
- 15 **[0196]** Con este procedimiento, embriones de pez cebra se generaron por primera vez en apareamiento natural y se recogieron, y se colocaron en agua de huevo preparada mediante la combinación de 5 gramos (g) de la sal Instant Ocean con 3 g de sulfato de calcio en 25 litros de agua destilada. Los embriones se trataron entonces con una dosis de 2 mg/ml de solución de pronasa durante 1 minuto a 28°C y se lavaron tres veces en agua de huevo para eliminar el corion. Los embriones se mantuvieron en el medio de huevo a lo largo de los experimentos. Debido a que el embrión del pez cebra se nutre del saco vitelino, no hay necesidad de mantenimiento adicional. Después de 12-14 horas de desarrollo, los embriones son tratados con 0,1 μ M a 1 μ M de ácido retinoico en dimetilsulfóxido (DMSO) al 0,5% durante 2 horas para inducir la muerte celular en el cerebro anterior y posterior del cerebro del pez cebra. La muerte celular en el cerebro anterior y posterior del cerebro puede ser detectada en aproximadamente 24 horas de desarrollo (ver las figuras 10A-10B). Los embriones después se lavaron dos veces en el agua de huevo y se mantuvieron a 28°C hasta que alcanzaron la etapa de desarrollo apropiado para la tinción.
- 20
- 25 2. Detección fluorescente de la muerte celular en embriones de pez cebra vivos

- [0197]** Para identificar las células sometidas a la muerte celular, los embriones se tiñeron con una membrana impermeante, tinte fluorescente de tinción nuclear, tal como un tinte de la familia de tintes de benzotiazolina-4-quinolina. Los tintes de benzotiazolina-4-quinolina son solubles en DMSO y se puede administrar al pez cebra mediante la adición de los tintes directamente al medio, que usualmente contiene DMSO. El pez cebra tolera bien altos niveles de DMSO.
- 30 **[0198]** Los embriones de pez cebra se generan y los coriones se eliminan tal como se describió anteriormente. Los embriones se dividen en 4 grupos:

- 1) embriones no tratados sin teñir (autofluorescencia + muerte celular)
- 2) embriones tratados sin teñir (autofluorescencia con muerte celular inducida)
- 3) embriones no tratados teñidos (tinte fluorescente + muerte celular normal)
- 4) embriones tratados teñidos

5 **[0199]** Los embriones de los grupos 2 y 4 se tratan con ácido retinoico a las 12 horas de desarrollo como se describió anteriormente. A las 20 horas de desarrollo, los embriones individuales de cada grupo se colocan en pocillos individuales de una placa de cultivo de múltiples pocillos (por ejemplo, placa de cultivo de 96 pocillos) en 100 microlitros (µl) de agua de huevo. Como los embriones de pez cebra se desarrollan normalmente en 100 µl de agua, los compuestos de prueba y los tintes pueden ser fácilmente añadidos directamente al medio en el que se mantienen los peces. En este procedimiento, el tinte fluorescente se añade al medio de los embriones de los grupos 3 y 4 en 1/5, 1/10, 1/50, 1/100 y 1/200 diluciones. Para cada concentración de tinte, los embriones son recogidos en intervalos de 30 minutos durante 4 horas. Los embriones se lavan dos veces en el tanque de agua durante 5 minutos. Los embriones son vistos usando un microscopio de epifluorescencia equipado con una cámara CCD para la detección de bajo nivel de luz. Las imágenes se recogieron y compararon mediante el uso de software estándar (por ejemplo, Photoshop, Adobe System). Los embriones del grupo 1 reflejan el nivel normal de autofluorescencia. Los embriones del grupo 2 reflejan autofluorescencia causada por las células apoptóticas o ácido retinoico. Los embriones del grupo 3 indican que normalmente se produce la muerte celular. Los embriones del grupo 4 proporcionan la base principal para el desarrollo del ensayo.

20 **[0200]** Para confirmar la exactitud de la detección fluorescente de la muerte celular (por ejemplo, la apoptosis), una ensayo de etiquetado final convencional de dUTP-biotina mediada con TdT (designado etiquetado final de nucleótidos de desoxiuridina terminal o "TUNEL") se realiza en los mismos embriones (grupos 1-4, descritos anteriormente). El ensayo de TUNEL se describe en Gavrieli et al., J. Cell. Biol. 119:493-501 (1992). Este ensayo es un procedimiento del etiquetado *in situ* de roturas de ADN en nucleicos, en secciones de tejidos procesados a través de procedimientos histopatológicos estándar. El procedimiento emplea desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) para el etiquetado final con fragmentos de ADN dentro del nucleico de las células apoptóticas. La TdT se une específicamente a los extremos 3'-OH del ADN, lo que garantiza una síntesis de un polímero de polideoxinucleótido. Después de la exposición de ADN nuclear en los cortes histológicos mediante tratamiento proteolítico, la TdT se utiliza para incorporar desoxiuridina biotinilada en los sitios de roturas en el ADN. La señal resultante es amplificada mediante avidina-peroxidasa, que permite la identificación histoquímica convencional mediante microscopía de luz.

30 **[0201]** Debido a que los embriones de pez cebra son transparentes, la tinción de TUNEL se puede hacer en formato de montaje en su conjunto. Los embriones completos se fijan en paraformaldehído al 4% durante la noche y se tiñen según el procedimiento TUNEL descrito por Gavrieli, supra. Los embriones se lavan en ddH₂O (agua destilada doble) y 10 mM Tris-HCl, pH 8. Los embriones son pre-tratados con tampón TdT (30 mM base Trizma, 140 mM cacodilato de sodio, pH 7,2, 1 M de cloruro de cobalto (CoCl₂)) durante 3 horas a 37°C. Los embriones se lavaron 3 veces durante 30 minutos en tampón fosfato salino con Tween 0,1% (PBST) a pH 7. PBST luego se reemplaza con una mezcla de reacción de tampón que contiene 40 µM TdT bio-16-dUTP (Enzo Biochemicals) y 0,3 unidades/µl de enzima TdT (IBI/Kodak) durante la noche a 37°C. La reacción se termina mediante el lavado de los embriones en una solución tampón 2x de citrato salino-sódico (SSC). Los embriones se enjuagan en PBS. Los nucleótidos con biotina se detectan mediante un complejo de estreptavidina conjugada con peroxidasa (HRP) de acuerdo con el protocolo del fabricante (reactivos A + B, Vectastain). La HRP se detecta mediante la incubación de las secciones de una solución de 3,3'-diaminobencidina (DAB) que contiene 500 µg/ml DAB, 0,2% CoCl₂, 0,2% NiSO₄ (NH₄) 2SO₄·6H₂O y 10% de H₂O₂ en tampón fosfato 1 M, pH 7,4. Los embriones teñidos se visualizan en un microscopio de luz compuesto.

45 **[0202]** Como prueba adicional de nuestro procedimiento de detección de la muerte celular, también examinamos la capacidad del tinte para etiquetar células en los embriones tratados con ibuprofeno, un inhibidor de la ciclooxigenasa, que produce un patrón característico de muerte celular. Este patrón consiste en una progresión posterior a anterior de las células que mueren tal como se indica mediante una progresión de los cambios de opacidad en las células del embrión.

50 **[0203]** Los embriones de 24 horas de desarrollo fueron pretratados durante 1 hora con una concentración de 100 nanomolar del tinte fluorescente (por ejemplo, tinte de benzotiazolina-4-quinolina) en el medio de embriones. Los embriones fueron expuestos a 100 µM de ibuprofeno por adición al medio y examinados por microscopía de luz y de epifluorescencia cada 15 minutos durante 2 horas. Los embriones de control fueron tratados previamente con la misma concentración de tinte, pero no fueron expuestos al ibuprofeno. Una hora después, las células fueron marcadas con fluorescencia detectada en el extremo posterior de la cola de los embriones experimentales, pero no en los embriones de control. En 1 hora y 30 minutos, las células marcadas se detectaron en un área grande, que se extendía desde la punta de la cola al nivel del ano. Durante dos horas, las células marcadas con fluorescencia podrían ser vistas en todo el embrión, en cambio, ningún patrón de células marcadas se observó en los embriones de control. Este patrón de células de etiqueta fluorescente era idéntico al patrón observado para los cambios de opacidad en el embrión.

3. Rescate de la actividad de la muerte celular inducida

[0204] Para determinar si el modelo de teleosteo podría ser utilizado para el cribado de compuestos que bloquean o reducen la actividad de la muerte celular, los embriones fueron microinyectados con un inhibidor de la caspasa 3 (Calbiochem # 264155) antes de la exposición al ibuprofeno.

- 5 **[0205]** En concreto, los embriones a las 24 horas de desarrollo se decoloraron y se microinyectaron con 25 μM de inhibidor de la caspasa 3 o PBS en el vitelo. A las 26 horas de desarrollo, los embriones fueron expuestos a 100 μM de ibuprofeno mediante adición al medio. En una hora, las células opacas se observaron en embriones inyectados con PBS, pero no en embriones inyectados con el inhibidor de la caspasa. En dos horas después de la adición de ibuprofeno, los embriones fueron inyectados con PBS totalmente opaco. Por el contrario, en los embriones inyectados con el inhibidor de la caspasa aún transparente, sin embargo, las células opacas habían comenzado a aparecer en la región más posterior de la cola de estos embriones. A las 24 horas después de la introducción de ibuprofeno, todos los embriones experimentales estaban muertos.

4. Compuestos de cribado de un efecto sobre la actividad de la muerte celular

- 15 **[0206]** Una gran variedad de compuestos pueden ser analizados por su potencial efecto sobre la actividad de la muerte celular (por ejemplo, actividad de apoptosis o necrosis) mediante el uso de los procedimientos de la presente invención. Fármacos terapéuticos o profilácticos, productos químicos, toxinas y productos farmacéuticos figuran entre los que se puede probar por sus efectos sobre la actividad de la muerte celular, incluyendo su capacidad para inhibir o activar la apoptosis.

- 20 **[0207]** Los compuestos que se proyectarán se pueden obtener de varias fuentes, incluyendo el depósito de productos naturales del Instituto Nacional del Cáncer, Bethesda, MD.

[0208] Un compuesto a ensayar se puede administrar a un teleosteo (por ejemplo, el pez cebra) *in vivo* mediante la disolución del compuesto en la solución o un medio que contiene el teleosteo. El compuesto es absorbido por el teleosteo. Alternativamente, el compuesto puede ser inyectado directamente en el teleosteo.

- 25 **[0209]** Cuando los compuestos de cribado para sus efectos sobre la actividad apoptótica, es útil comparar un ensayo utilizando embriones de teleosteos en el que el compuesto de ensayo ha sido administrado con embriones a los que se les ha administrado ácido retinoico. Para tales ensayos comparativos, los embriones de teleosteos se dividen en cuatro grupos:

- 1) No ácido retinoico, no compuesto de ensayo (control normal)
- 2) Ácido retinoico, no compuesto de ensayo (control de la muerte celular inducida)
- 30 3) No ácido retinoico, compuesto de ensayo
- 4) Ácido retinoico, compuesto de ensayo

- 35 **[0210]** Los procedimientos de detección se realizaron tal como se describió anteriormente. En concreto, los embriones de pez cebra que pertenecen a los grupos 2 y 4 se tratan con ácido retinoico en las mismas condiciones, tal como se describió anteriormente, para inducir el mismo grado de apoptosis. Los embriones de pez cebra que pertenecen a los grupos 3 y 4 se exponen a la sustancia de ensayo. Todos los embriones se tiñen con el tinte y las imágenes son recogidas a través de un microscopio de epifluorescencia (Nikon E600) equipado con una cámara CCD para la detección de bajo nivel de luz. Los embriones de pez cebra de cada grupo se comparan mediante el uso de software y análisis de imágenes. Los embriones del grupo 1 sirven como embriones de control (normal). Los embriones del grupo 2 proporcionan un control para el nivel de la apoptosis inducida por el ácido retinoico. Los embriones del grupo 3 demuestran la capacidad del compuesto de ensayo para inducir apoptosis. Los embriones del grupo 4 representan la capacidad del compuesto de ensayo para inducir o suprimir la apoptosis en relación al ácido retinoico. Los cambios absolutos en el área de la señal de la apoptosis y el número de células apoptóticas se utilizan para determinar si el compuesto de ensayo ha tenido un efecto sobre la actividad apoptótica.

- 45 **[0211]** En particular, los procedimientos de la presente invención se llevan a cabo en embriones de teleosteos vivos transparentes. El efecto de un compuesto de ensayo sobre la actividad de la muerte celular (por ejemplo, la actividad de apoptosis o necrosis) *in vivo* se puede determinar a lo largo del tiempo mediante el examen de los grupos identificados anteriormente del embrión de pez cebra en intervalos de 24 horas, durante un período de hasta 4 días. El efecto de un compuesto sobre la muerte de las células de un órgano en particular (por ejemplo, el cerebro) o tejido de un teleosteo puede ser examinado a lo largo del tiempo. Patrones específicos de órganos y tejidos específicos de la muerte celular pueden ser identificados. Además, la persistencia y la duración del efecto del compuesto pueden ser determinadas mediante los procedimientos de la invención. Además, el efecto de un compuesto de uno o los dos del embrión completo o en órganos específicos y sistemas de tejido (por ejemplo, el sistema cardiovascular, el sistema entérico y el sistema de la musculatura) se puede determinar *in vivo* de forma simultánea o independiente. Debido a que los teleosteos, tales como el pez cebra, son fáciles de generar y el ensayo es fácilmente reproducible, un gran número de compuestos de prueba pueden ser seleccionados con facilidad y rapidez para sus respectivos efectos sobre la

regulación de la actividad y la muerte celular, incluyendo la apoptosis y/o la necrosis.

[0212] Con los procedimientos que utilizan tinte de benzotiazolina-4-quinolina no se puede distinguir entre un efecto potencial de un compuesto en particular que puede tener en los procesos de apoptosis y los procesos necróticos. En un embrión en desarrollo, la muerte celular necrótica rara vez se produce a menos que el embrión se dañe por una lesión no fisiológica causada, por ejemplo, por manipulación física. Para eliminar el perjuicio no fisiológico a un embrión (y así eliminar cualquier muerte de las células resultantes de la necrosis), los embriones decolorados se mantienen en pocillos revestidos de agar. La capa de agar evita rozaduras con el ectodermo de los embriones. Estas abrasiones se pueden producir cuando los embriones se ponen en contacto con las superficies de plástico. Para evitar mayores lesiones no fisiológicas a los embriones, cada embrión no se maneja una vez que se coloca en un pocillo de la placa de cultivo de múltiples pocillos. El tefido, la exposición compuesta, y las observaciones sobre todos los embriones se pueden realizar en la placa de cultivo de múltiples pocillos y sin manipular los embriones, lo que reduce la posibilidad de daño necrótico de los embriones. Sustratos específicos fluorogénicos que informen de la actividad enzimática (por ejemplo, la actividad de la caspasa enzimática) pueden ser utilizados en embriones de teleosteos transparentes y pueden ayudar a distinguir entre la actividad de apoptosis y necrosis.

[0213] Debido a que los embriones de teleosteos, tales como el pez cebra, se pueden mantener en pequeños volúmenes de líquido (por ejemplo, 100 µl) durante los primeros cuatro a cinco días de desarrollo, los embriones unitarios se pueden mantener en los pocillos individuales de una placa de cultivo de múltiples pocillos (por ejemplo, de 96 pocillos). Por otra parte, varios embriones (por ejemplo, 10 embriones) se pueden mantener en cada pocillo de una placa de cultivo de 24 ó 48 pocillos, o similares. Esto hace posible la detección de señales, incluyendo, por ejemplo, señales fluorescentes, de colorimetría, radiactivas y quimioluminiscentes utilizando lectores de placas de microtítulo estándar y automatizar los procedimientos de tinción de AP y la detección de una variedad de compuestos por sus efectos sobre la actividad de la muerte celular.

[0214] Además de la automatización de la detección, la manipulación de la muestra puede ser automatizada para la aplicación rápida reproducible de tintes y compuestos de los teleosteos mediante los procedimientos descritos en este documento. Para aumentar el rendimiento de una aplicación compuesta, sistemas robóticos disponibles en la actualidad (tal como BioRobot 9600 de Qiagen, Zymate de Zymark o Biomek de Beckman Instruments) - la mayoría de los cuales utilizan el formato de placas de cultivo de múltiples pocillos - se pueden utilizar con los procedimientos de la invención. Un sistema de instrumentación bien conocido y disponible en el mercado puede ser empleado para automatizar la hibridación *in situ* y el registro de datos y sistemas de recuperación y otros aspectos de los procedimientos de cribado de la invención.

[0215] La presente invención proporciona también procedimientos de cribado de un compuesto para un efecto sobre la actividad de la muerte celular *in vivo*, que comprenden la administración del compuesto a un teleosteo *in vivo* y la detección de una respuesta en los teleosteos que indica un efecto sobre la actividad de la muerte celular, en el que una librería de los compuestos se analiza para detectar un efecto sobre la actividad de la muerte celular, incluyendo la actividad de apoptosis y necrosis. En algunos procedimientos, la librería de compuestos incluye compuestos naturales. En otros procedimientos de la invención, la librería de compuestos comprende compuestos sintéticos. Sin embargo, en otros procedimientos de la invención, la librería es una librería combinatoria. Los procedimientos de la invención son útiles para cribar el compuesto y las librerías químicas para moléculas que reprimen o activan la muerte celular, incluyendo la represión o activación de apoptosis o necrosis.

IV. PROCEDIMIENTOS DE CRIBADO DE UN AGENTE PARA LA ACTIVIDAD TÓXICA

A. Pruebas de toxicidad del animal entero

[0216] Los procedimientos predominantes de ensayo de la toxicidad utilizan ensayos basados en células para evaluar el impacto potencial de diferentes compuestos en la salud humana y animal. El efecto citotóxico de los productos químicos en las células de mamíferos es principalmente medido por la viabilidad celular y la síntesis de ADN no programada. Debido a la toxicidad, estos cribados están diseñados para evaluar el efecto *in vitro* de un compuesto contra dianas celulares, están limitados en su capacidad para predecir los efectos a nivel del organismo, incluida la mortalidad. En contraste, el uso de animales completos para pruebas de toxicidad se refiere a la limitación de los ensayos basados en células y permite la evaluación simultánea en los niveles molecular y celular.

[0217] Las pruebas de embriones enteros ya ha llevado a cabo en los invertebrados, incluyendo mosca de la fruta y nematodos (Eisses, Teratog. Carcinog. Mutagen 9:315-325 (1989); Hitchcock et al, Arch. Environ. Contam. Toxicol 33:252-260 (1997)). Sin embargo, como los invertebrados no están estrechamente relacionados con los seres humanos y muchos de ellos carecen de los mismos órganos y enzimas, el uso de dichos resultados como indicadores de efectos tóxicos en los seres humanos son limitados. Las pruebas de toxicidad en embriones mamíferos se dividen en dos categorías: 1) ensayos de cultivo utilizando ratas o embriones de ratón, y 2) ensayos *in utero* en el que los compuestos se inyectan en el peritoneo de un ratón o una rata embarazada. Aunque la técnica de cultivo de ratón y de rata con el embrión completo es un procedimiento validado para las pruebas de toxicidad en los vertebrados (Chatot et al, Science 207:1471-1473 (1980); Circurel y Schmid, Xenobiotica 18:617-624 (1988)), las pruebas de toxicidad con este procedimiento son complicadas y sólo un número limitado de ensayos caros se puede realizar. Los embriones deben ser cuidadosamente explantados con el saco vitelino visceral y el cono ectoplacental intacto a los 8,5 días de

desarrollo. El tiempo de cultivo de los embriones también está limitado a 48 horas (Bechter et al. Teratol. 44:29 A (1991)). Además, debido a la complejidad de las condiciones de cultivo, la incidencia de falsos positivos y falsos negativos es alta (Guest et al., Can. J. Physiol. Pharmacol. 72 (1):57-62 (1994)). El enfoque *in utero* evita estos problemas; sin embargo, este enfoque se complica por el hecho de que los compuestos que se están probando pueden ser metabolizados en el hígado de la madre. Además, aunque el enfoque *in utero* es útil para examinar los efectos prenatales, no es útil para evaluar los efectos tóxicos de un compuesto sobre el desarrollo postnatal. El sistema de embrión de la rana es otro modelo de uso común en los ensayos de toxicidad *in vitro*; sin embargo, como los embriones de rana no son transparentes, es muy difícil examinar las actividades tóxicas contra determinados tejidos y órganos a lo largo del tiempo o de forma simultánea. Un procedimiento que permite la detección de un agente tóxico para la actividad de varios órganos y tejidos de un animal de forma simultánea y/o en el animal *in vivo* es necesario.

B. Procedimientos de cribado de la actividad tóxica

[0218] La presente invención proporciona procedimientos de cribado de un agente para una actividad tóxica en un animal intacto entero o en tejidos y órganos de animales enteros *in vivo* o en células *in vitro* con células del animal. Esta actividad puede ser evaluada en relación con teleósteos de control contemporáneos y/o históricos (o tejidos, órganos o células de teleósteos) a los que el agente no se ha administrado. Estos procedimientos comprenden la administración del agente a un teleósteo y la detección de una respuesta en el teleósteo que indica la actividad. Estos procedimientos son útiles para un rápido, exhaustivo y reproducible cribado y predicción de las respuestas tóxicas, incluidos los efectos nocivos y letales en los órganos en desarrollo y los tejidos de los teleósteos completos, debido a los agentes particulares.

[0219] El pez cebra es uno de los teleósteos preferidos para estos procedimientos. Como se ha indicado anteriormente en detalle, el pez cebra ofrece una serie de ventajas para las pruebas de toxicidad, incluyendo que los peces cebra son transparentes (lo que facilita la observación y el análisis de múltiples tejidos y órganos al mismo tiempo), se desarrollan rápidamente, son fáciles y baratos de generar y de mantener, y son susceptibles de un cribado de toxicidad de alto rendimiento. Además, las bases morfológicas y moleculares de los tejidos y el desarrollo de órganos en general son idénticos o similares a otros vertebrados, incluido el hombre, y por lo tanto el cribado de toxicidad de los compuestos en los peces cebra proporciona información relevante sobre el efecto de los compuestos en los seres humanos. Además, hemos determinado que los teleósteos exhiben una relación dosis-respuesta a la toxicidad y por lo tanto, el pez cebra y los procedimientos de cribado de toxicidad descritos en este documento son útiles para determinar los efectos de dosis particulares de agentes de en órganos particulares y sistemas de tejidos y la sensibilidad de determinados órganos y tejidos para tales dosis.

[0220] Como se describió anteriormente, el compuesto que se cribará se puede administrar a los teleósteos por difusión simplemente añadiéndolo al medio que contiene el teleósteo o mediante microinyección o técnicas similares que son conocidas para un experto en la materia.

[0221] La presente invención incluye procedimientos *in vivo* para agentes de cribado de un efecto tóxico o actividad en uno o más órganos (por ejemplo, riñón, páncreas, sistema cardiovascular, sistema nervioso central, hígado, etc.) o los tejidos de manera simultánea o independiente. También se incluyen procedimientos *in vitro* en los que se administra un agente para un cultivo de células del animal y la respuesta que indica la actividad se detecta en las células. Todos estos procedimientos se pueden utilizar para detectar una amplia gama de agentes y compuestos, incluyendo, entre otras cosas, compuestos químicos, productos farmacéuticos, terapéuticos, agentes medioambientales y agrícolas, agentes industriales, contaminantes, cosmecéuticos, compuestos naturales o sintéticos, fármacos, compuestos orgánicos, lípidos, glucocorticoides, péptidos, antibióticos, moléculas quiméricas, azúcares, carbohidratos, etc. Estos agentes y compuestos pueden ser examinados por separado o como mezclas, incluidas las mezclas complejas.

[0222] Los procedimientos de la presente invención permiten la investigación de procedimientos moleculares para evaluar el hígado y las enzimas clave del riñón como biomarcadores de toxicidad en los órganos. Técnicas sustractivas de librería y varios ensayos enzimáticos, en combinación con fármacos de toxicidad conocida, se pueden utilizar para identificar nuevos genes implicados en la respuesta al fármaco y fenómenos de activación metabólica y, por lo tanto, contribuir a la creación y validación de nuevos biomarcadores.

[0223] Los efectos y la actividad tóxica resultante de la administración de un compuesto a un animal (por ejemplo, teleósteo) puede ser indicada por una variedad de respuestas en el animal, incluyendo pero no limitado a, por ejemplo, cambios moleculares, mutaciones genéticas, defectos en el desarrollo, retraso en el desarrollo, genotoxicidad, toxicidad reproductiva, toxicidad en los órganos o disgenesia, toxicidad del comportamiento, teratogenicidad, muerte del animal, etc. Las respuestas que indican actividad tóxica pueden ser detectadas en el teleósteo completo o por lo menos en un tejido u órgano del teleósteo. La respuesta puede ser detectada en varios tejidos y órganos simultáneamente o por separado en el tiempo en intervalos de tiempo predeterminados. Por ejemplo, la respuesta puede ser detectada en al menos dos tejidos diferentes, por lo menos dos órganos distintos, o por lo menos en un órgano y por lo menos un tejido. En los procedimientos *in vitro*, la respuesta es detectada en una o más células del teleósteo.

[0224] Además, una respuesta que indica la actividad tóxica puede ser detectada como un cambio en el perfil de la expresión génica (ARNm) para una o más células, tejidos, órganos del animal, o en el animal entero, mediante la

extracción y la medición del nivel(es) de uno o más ARNm expresados en estas célula(s), tejido(s), órgano(s) o el teleosteo completo en un momento determinado después de la administración del agente y/o en un conjunto de condiciones. Para ello, se pueden realizar experimentos de sustracción de la librería. El ARNm de los embriones de control (sin tratamiento) y experimentales (tratados) se extrae en un período de respuesta temprano y tardío. Las librerías de sustracción se construyen con el sistema de sustracción de ADNc de selección de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (CLONTECH Laboratories, Inc.). Los genes del embrión que se expresan diferencialmente como consecuencia de la exposición al compuesto aislado de forma selectiva, clonado y caracterizado mediante el procedimiento habitual. El ADNc se utiliza para la construcción de una micromatriz de ADNc.

[0225] Una respuesta que indica la actividad tóxica también puede ser detectada como un cambio en el perfil de expresión de proteínas de una o más células, tejidos, órganos del animal, o el animal completo, mediante la extracción y la medición del nivel(es) de una o más proteínas diferentes expresadas en esta célula(s), tejido(s), órgano(s), o el animal completo en un momento determinado después de la administración del compuesto y/o en un conjunto particular de condiciones. En este enfoque basado en proteínas, las diferencias en la modificación post-traducciona l o el procesamiento, tales como la división, se pueden examinar utilizando la electroforesis bidimensional en gel de poli acrilamida. Extractos de embriones de control y los expuestos a compuestos pueden ser comparados directamente en el mismo gel, mediante el etiquetado de cada extracto con un fluoróforo diferente antes de la separación electroforética. Las etiquetas no tienen ningún efecto sobre la migración relativa de las proteínas marcadas durante la electroforesis. Las proteínas que aparecen sin modificaciones en ambas muestras aparecen como puntos compuesto por dos tintes fluorescentes. Las proteínas que difieren entre las dos muestras, como resultado de la escisión, la fosforilación, etc., son etiquetados fluorescentes en la muestra original extraída.

[0226] Un experto en la materia reconocería que una variedad de técnicas se pueden utilizar juntas o por separado para generar una señal (por ejemplo, hibridación *in situ*, tinción de anticuerpos de proteínas específicas, etc.) y para detectar y evaluar las respuestas (por ejemplo, colorimetría, microscopía de fluorescencia, microscopía óptica, análisis de imagen digital, técnicas de lector de microplacas estándar, fluorometría, incluyendo fluorometría que se resuelve con el tiempo, y quimioluminiscencia, inspección visual, cámaras CCD, cámaras de vídeo, película fotográfica, o el uso de los instrumentos actuales, tal como dispositivos de escaneado láser, fluorómetros, fotodiodos, contadores cuánticos, lectores de placas, microscopios de epifluorescencia, microscopio de escaneado, microscopios confocales, citómetros de flujo, detectores de electroforesis capilar, o mediante amplificación de la señal, tal como un tubo fotomultiplicador.

C. Agentes de cribado para la actividad tóxica y/o actividad de la angiogénesis y/o actividad de la muerte celular simultáneamente

[0227] Los procedimientos para el cribado de agentes para la actividad tóxica descritos en este documento se pueden combinar con otros procedimientos de la presente invención, incluyendo procedimientos de cribado de agentes para la actividad de la angiogénesis (Sección II) y la actividad de la muerte celular (Sección III). Como se señaló anteriormente, con los teleosteos transparentes, es posible evaluar este tipo de actividades múltiples y las respuestas resultantes de tales actividades en los teleosteos su totalidad o en uno o más tejidos u órganos al mismo tiempo y en intervalos de tiempo predeterminados. Los ensayos de combinación de detección de toxicidad con la detección de actividad de la muerte celular son útiles como se indicó anteriormente para identificar las respuestas nocivas y letales como resultado de la administración del agente, las cantidades apropiadas de dosis, y en el desarrollo de terapias eficaces y programas de tratamiento.

[0228] Una variedad de técnicas se pueden utilizar juntas o por separado para analizar las múltiples actividades y las respuestas, incluyendo microscopía de fluorescencia, microscopía óptica, análisis de imagen digital, técnicas estándar de lector de microplacas (colorimetría, fluorometría, incluyendo fluorometría que se resuelve con el tiempo, y quimioluminiscencia), hibridación *in situ*, tinción de anticuerpos de proteínas específicas, cambios enzimáticos, cambios en la distribución de las proteínas temporal y espacialmente en el teleosteo, etc.

[0229] En un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento el cribado de un agente para una actividad tóxica, como se ha descrito anteriormente, que comprende, además, el agente de detección de un efecto sobre la actividad de la muerte celular mediante la detección de una respuesta en los teleosteos que indica un efecto sobre la muerte celular actividad (como se mencionó anteriormente). Los patrones específicos de tejidos y órganos de la muerte celular pueden ser evaluados, además de examinar los diferentes marcadores para analizar la toxicidad de los órganos. Las células sometidas a la muerte celular pueden ser identificadas mediante una variedad de medios, incluyendo los antes mencionados (por ejemplo, utilizando una membrana impermeante, tinte de tinción nuclear de la familia de tintes de benzotiazolina-4-quinolina, el ensayo TUNEL, o ensayo enzimático colorimétrico o fluorométrico de la actividad de la caspasa).

[0230] En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento de cribado de un agente para una actividad tóxica, como se ha descrito anteriormente, que comprende, además, el cribado del agente para un aumento o disminución en la angiogénesis mediante la detección de una respuesta en el teleosteo que indica un aumento o disminución de la actividad de la angiogénesis.

Ejemplos1. Compuestos de cribado de la actividad tóxica en el hígado y los riñones en el pez cebraA. Procedimientos1) Recogida de embriones

- 5 **[0231]** Los embriones de pez cebra de tipo salvaje fueron generados por apareamiento de pares naturales, clasificados para la viabilidad, y se recogieron tal como se describe en la Sección II para los procedimientos de cribado de la actividad de la angiogénesis. Los embriones antes fueron ordenados para la viabilidad. Debido a que el embrión del pez recibe el alimento de un saco vitelino adjunto, no hay necesidad de mantenimiento adicional.

2) Cribado del compuesto

- 10 **[0232]** Como se mencionó anteriormente, una variedad de compuestos pueden ser cribados mediante los procedimientos descritos para la actividad tóxica en animales enteros (por ejemplo, teleósteos) y órganos y tejidos específicos. Los efectos de la toxicidad en el desarrollo de los compuestos terapéuticos/farmacológicos también pueden ser estudiados; los resultados con dichos compuestos usando teleósteos se pueden comparar con los resultados obtenidos por el NCI utilizando modelos de mamíferos. Mediante esta comparación, por ejemplo, se puede evaluar el
- 15 uso de los procedimientos y modelos animales de la invención para los ensayos de predicción de efectos de toxicidad en el desarrollo de compuestos con potencial terapéutico.

3) Mantenimiento de los embriones y administración de compuestos

- [0233]** Los embriones de pez cebra fertilizados fueron obtenidos por desove natural en nuestra instalación de acuicultura. Para reducir las variaciones entre lotes, se utilizaron muestras al azar de los embriones a partir de 3 ó 4
- 20 cruces independientes. El medio de ensayo ha sido preparado mediante la combinación de 5 g de sal Instant Ocean, con 3 gramos de CaSO_4 en 25 litros de agua destilada, de acuerdo con Westerfield, supra. Los embriones se mantuvieron en el medio de prueba a lo largo de los experimentos. Los embriones a las 24 horas de desarrollo (con corion) fueron expuestos continuamente durante cinco días a compuestos químicos a diferentes concentraciones de los compuestos químicos y los controles. En general, las concentraciones variaron de 100 nanomolar (nM) a 100
- 25 micromolar (μM). Las pruebas se repitieron cuatro veces para cada serie de diluciones, y se calculó una desviación estándar para cada tratamiento (véase la sección de "Procedimientos Estadísticos"). Diez embriones por concentración fueron expuestos en un volumen total de 1 ml (razón constante de 100 μl /embrión) con una placa de 24 múltiples pocillos. (Otros tamaños de placas de múltiples pocillos, tales como placas de 96 pocillos también se pueden utilizar para facilitar la inspección). Los compuestos se renovaron diariamente. En todos los casos, dimetilsulfóxido (DMSO) al
- 30 0,1% fue utilizado como disolvente portador durante el tratamiento. Controles con y sin DMSO al 0,1% se realizaron en todos los experimentos. Este enfoque ha sido utilizado para introducir anestésicos y otros productos químicos en embriones de peces (Westerfield, supra).

- [0234]** Los experimentos se llevaron a cabo a una temperatura constante (28 a 28,5°C) en la oscuridad para proteger los compuestos de la descomposición debido a la exposición a la luz. Los embriones muertos fueron retirados
- 35 todos los días, contados, y se utilizaron para calcular la concentración letal media (LC50, ver la sección "Procedimientos Estadísticos"). Cada día, los embriones sobrevivientes fueron analizados visualmente bajo un microscopio binocular de disección (Zeiss, amplificación de 30-50X). Malformaciones macroscópicas (como defectos axiales, mortalidad embrionaria, inhibición del crecimiento, malformaciones generales, que incluyen microcefalia, macrocefalia, truncamiento de la cola, malformación de la cola, pérdida de las estructuras axiales, tal como somitas, etc.) se
- 40 observaron, clasificaron, y contaron para evaluar la toxicidad del animal completo. Los compuestos que fueron letales o inducido estas o cualquier malformación observada o interrupciones durante el desarrollo (por ejemplo, durante los primeros 5 días de desarrollo) también se estudiaron para los efectos tóxicos en órganos. La etapa del desarrollo embrionario que se ve afectada por el compuesto tóxico se puede determinar. La toxicidad en los órganos puede ser evaluada en la supervivencia de embriones utilizando hibridación *in situ*, ensayos enzimáticos, y procedimientos de
- 45 inmunoquímica.

- [0235]** Para los medicamentos terapéuticos cribados para los efectos tóxicos, puede ser determinada la concentración efectiva media (EC50) (la concentración media necesaria para causar un efecto deseable en un objetivo). La ventana terapéutica (TW) (por ejemplo, LC50/CE50) también se puede determinar; los compuestos que muestran una ventana terapéutica alta, por ejemplo, 100 ó 1.000, son buenos candidatos potenciales para medicamentos debido
- 50 a que la toxicidad en la concentración terapéutica es baja.

4) Pruebas de toxicidad en tejidos y órganosa) Hibridación *in situ*

- [0236]** Para estudiar la degeneración de tejido y órganos específicos, se puede utilizar el montaje completo de hibridación *in situ* con sondas de ARN marcadas con digoxigenina (Boehringer Mannheim). Las sondas que tiñen los
- 55 primeros tejidos embrionarios incluyen MyoD, para el mesodermo paraxial durante la somitogénesis; braquiuria, para la

notocorda. Las sondas que específicamente tiñen los órganos incluyen *krx20* y *pax2* para la detección de un desarrollo anormal del cerebro medio caudal y la parte posterior del cerebro anterior; *c-ret* para el cerebro de presunción, la médula espinal y el sistema excretor (el desarrollo de los riñones; dúo néfricos y pronefros) y *pes* para tectum óptica, primordio del hígado y el intestino. La hibridación *in situ* se lleva a cabo de la siguiente manera: los embriones son fijados con paraformaldehído al 4% en PBS y se hibridó a 65°C. Para la inspección visual bajo un microscopio, anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina se utiliza para detectar señales después de la tinción con NBT/X-fosfatasa (Boehringer Mannheim). Los efectos de la toxicidad en los tejidos y el desarrollo de órganos y la función (por ejemplo, el hígado y los riñones), la expresión y la inducibilidad de una isoenzima constituyente LMC2 y las isoenzimas inducibles con dioxinas LM4B de citocromo (Cyt.) P-450 en diferentes órganos y tejidos mediante localización inmunohistoquímica puede ser analizados usando los procedimientos descritos en Buchmann et al. Toxicol. Appl. Pharmacol. 123:160-169 (1993).

[0237] El análisis automatizado de imágenes de hibridación *in situ* se realiza fácilmente utilizando anticuerpo de anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina para detectar señales después de la tinción con NBT/X-fosfatasa.

b) Evaluación de la actividad tóxica en el hígado por tinción

[0238] La actividad tóxica en el hígado de los animales completos tratados puede ser evaluada visualmente mediante un procedimiento rápido de tinción colorimétrica. Este procedimiento se basa en el uso de una enzima conjugada reportera de estreptavidina (avidina), tal como la peroxidasa, para detectar las enzimas de carboxilasa biotinadas naturalmente en el hígado, los intestinos y el tubo digestivo de los animales completo, tal como embriones de pez cebra. Estas enzimas que contienen biotilil-lisina, tal como acetil-CoA carboxilasa y otras carboxilasas, se encuentran predominantemente en el hígado y el tubo digestivo. Como resultado, la tinción es específica en determinados órganos (figura 11). Se puede hacer la evaluación cuantitativa de la biotina en el hígado. Mediante la detección visual de la biotililación, se puede determinar el tamaño y la ubicación del hígado.

[0239] Los embriones de pez cebra (de 4, 5 ó 6 días de edad) fueron fijados con paraformaldehído al 4% durante 1 hora a temperatura ambiente y se trataron con metanol al 100% durante la noche a -20°C. Los embriones fueron rehidratados y se lavaron con PBST. Después del lavado con PBST, los embriones fueron incubados en solución de bloqueo (BSA al 3%, 100 mM de NaCl en PBST) durante 1 hora y se trataron con una solución blanqueadora (formamida al 5%, 0,5X SSC, H₂O₂ al 10%) durante 20 minutos en condiciones de iluminación de luz natural. Después del blanqueamiento, los embriones fueron incubados por segunda vez con la misma solución de bloqueo durante 1 hora y se incubaron con estreptavidina conjugada con peroxidasa (Pierce) (dilución 1:100 en la misma solución de bloqueo) con agitación a temperatura ambiente durante 2 horas. Los embriones fueron lavados veinte minutos tres veces con PBST y se tiñeron para la peroxidasa con dos diferentes tintes: Diaminobencidina (DAB) (Pierce) (insoluble) para evaluar la tinción del hígado y 2,2'-Azino-bis (3-Etilbenz-tiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS) (Sigma) (soluble) para medir una señal visual cuantitativa mediante un procedimiento colorimétrico. La solución de tinción DAB utilizada comprendía: 1 ml de solución de stock DAB (5 mg de Diaminobencidina/ml en PBS, pH 7,4), 9 ml de PBS, 10 µl de H₂O₂ (30%). Normalmente, la tinción específica del hígado se visualizó en 1-5 minutos. La tinción de la solución DAB fue detenida mediante varios lavados con agua. El procedimiento ABTS colorimétrico utilizó 10 ml de solución de ABTS (10 mg en 33 ml de 0,1 M pH ácido cítrico/OH, 4,35), más 10 µl de peróxido de hidrógeno (30% de stock) y se realizó durante 30 minutos a temperatura ambiente con por lo menos 5 embriones por condición (1 ml de solución de ABTS/ 5embriones). La tinción ABTS fue detenida con 20% SDS/50% N'N-dimetilformamida. La señal de ABTS fue detectada mediante la medición de la absorbancia de la solución a 405 nanómetros (nm) usando un espectrofotómetro. Para cada condición, se realizaron cuatro repeticiones y la desviación estándar de "S" fue calculada tal como se indica en "Procedimientos Estadísticos" a continuación.

c) Evaluación de la actividad tóxica en el riñón mediante tinción

[0240] La actividad tóxica en el riñón (pronefros) se puede evaluar visualmente mediante tinción colorimétrica de los riñones de los animales tratados enteros (por ejemplo, el pez cebra). Los pronefros del pez cebra expresan altos niveles de la fosfatasa alcalina de la enzima que pueden ser fácilmente determinados utilizando un tinte cromogénico. Para teñir los riñones en embriones de pez cebra, los embriones fueron fijados con paraformaldehído al 2% durante la noche a 4°C y luego se trataron con metanol al 100% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los embriones fueron rehidratados y equilibrados en tampón NTMT (50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 100 mM Tris/HCl, pH 9,5, Tween 20 al 0,1%) a temperatura ambiente y luego se tiñeron con una solución de tinción (75 mg/ml de NBT y 50 mg/ml de X-fosfato, equilibrada en el mismo tampón). Normalmente, la tinción específica del riñón se visualizó en 10-20 minutos (figura 14). Este procedimiento de tinción se utilizó para evaluar la actividad tóxica de la aspirina y la dexametasona en el riñón (ver más abajo).

d) Evaluación de la actividad enzimática

[0241] La metodología para evaluar la actividad enzimática consiste en la exposición de los embriones de teleosteos a compuestos diferentes en diferentes momentos (horas o días) con el consiguiente análisis *in vitro* de la actividad de las enzimas diferentes. Los embriones se incuban en una placa de múltiples pocillos en presencia o no (es decir, controles) de los diferentes compuestos. Después de la exposición, se utilizan para obtener preparaciones de lisado celular. Las enzimas son analizadas mediante el uso de tintes colorimétricos o fluorométricos en experimentos de

punto final o cinéticos. Las placas se leen en un lector de microplacas apropiado. Se pueden construir micromatrices multienzimáticas.

5) Evaluación de la actividad tóxica del órgano de la aspirina y dexametasona

5 **[0242]** En los estudios de factibilidad, la aspirina y dexametasona fueron cribados para la actividad tóxica en embriones de pez cebra mediante los procedimientos de la invención aquí descritos. La aspirina, un inhibidor general de las ciclooxigenasas (Bosman, Skin Pharmacol. 7:324-334 (1994)), se había demostrado que produce toxicidad en una variedad de órganos en los embriones de mamíferos, incluyendo el riñón (Ungvary et al. Teratology 27 (2) :261-69 (1983)). La dexametasona, un inmunosupresor (Iida et al. Carcinogenesis 19:1191-1202 (1998)), se había demostrado que produce toxicidad hepática y gastrointestinal y ser hepatotóxica en los niños sometidos a tratamiento contra el

10 **[0243]** Los resultados se presentan en la Tabla 4. Al igual que con la aspirina, para la dexametasona la LC50 obtenida con los embriones de pez cebra es similar a los valores descritos anteriormente para los ratones y las ratas (Tabla 4). La toxicidad hepática y gastrointestinal y un efecto de dosis-respuesta, también se observaron (figuras 12A-12B). El procedimiento colorimétrico cuantitativo de punto final discutido anteriormente se utilizó para medir el efecto del

15 tratamiento con fármacos en el hígado (figura 13). El tratamiento con 100 μ M de dexametasona reduce la señal colorimétrica en un 70%, en comparación con los embriones sin tratamiento (control, 0% dexametasona, figura 13). El cambio en el color correlacionado con la reducción del tamaño ya se observó en el hígado usando un tinte cromogénico (figura 12B, abajo), lo que sugiere la reproducibilidad y la precisión de la prueba. El procedimiento fue cuantitativo (con buenos límites de confianza), rápido y fácil de realizar.

20 **[0244]** El procedimiento se puede automatizar usando instrumentación y técnicas conocidas de cribado tóxico automatizado.

Tabla 4: Prueba de toxicidad de pez cebra de cinco días comparada con modelos de mamíferos¹

Compuesto probado	Pez cebra		Modelos de mamíferos	
	LD ₅₀ ² (mg/litro)	Toxicidad específica observada	LD ₅₀ (mg/kg)	Toxicidad específica (de la literatura ³)
1. Aspirina (Inhibidor de la ciclooxigenasa)	101	teratogen, riñón, contracción muscular, movimientos erráticos	250 (ratones, or.) ⁴ 200 (ratas, or.) 167 (ratones, i.p.) ⁵	riñón, uretra, cardiovascular, craneofacial, musculoesquelético
2. Dexametasona (inmunosupresor)	324	hígado, gastro-intestinal	410 (ratones, i.p.) 54 (ratas, i.p.)	hígado, gastro-intestinal

¹ Incluyendo ratones y ratas.

² El LD₅₀ se calculó tal como se indica en "Procedimientos estadísticos".

³ Los datos se obtuvieron de la búsqueda web TOXNET y otras fuentes.

⁴ or. = oralmente

⁵ i.p. = intraperitoneal

6) Procedimientos Estadísticos

25 a) Estimación de LC50

[0245] Para las concentraciones ensayadas con aspirina y dexametasona en estos estudios, no hubo mortalidad parcial y la media geométrica de los parámetros fue tomada "sin mortalidad" (0%) y "mortalidad" (100%) de la concentración de efecto como los límites de confianza LC50 y binomial se calcularon de acuerdo con Stephan, "Methods for calculating LD50" en Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (F.L. Mayce y J.L. Hamelink eds.) ASTM STP 634, páginas 65-84. Amer. Soc. Testing Materials, Philadelphia, PA (1977).

b) Desviación estándar

[0246] El procedimiento de teñido colorimétrico del hígado descrito anteriormente se utilizó para obtener datos cualitativos (es decir, cambios en el tamaño, la presencia, o la ubicación del órgano) y para estudiar la

significación de las variaciones encontradas en cada tratamiento. Para cada condición, se realizaron cuatro repeticiones y el valor estadístico, con su desviación estándar, se utilizó para preparar gráficos utilizando Microsoft Excel 97 o software estándar/programas de gráficos conocidos similares.

7) Efectos teratogénicos

- 5 **[0247]** La información acerca de las respuestas tóxicas/efectos adicionales que indican la actividad tóxica de un compuesto, como, por ejemplo, la inhibición del crecimiento y teratogénesis, incluyendo microcefalia, macrocefalia, truncamiento de la cola, malformaciones de la cola, puede ser evaluada mediante inspección visual usando un microscopio de disección (Zeiss, amplificación de 30-50X). Múltiples respuestas tóxicas y los efectos pueden ser evaluados rápidamente y de forma simultánea en los embriones de teleósteos transparentes.

10 8) Evaluación de biomarcadores adicionales

- [0248]** Los anticuerpos disponibles en el mercado pueden ser utilizados para detectar la expresión y la inducibilidad de diferentes enzimas del riñón y del hígado mediante técnicas de inmunohistoquímica. Con estos marcadores, la toxicidad de los fármacos y compuestos, incluso los que tienen toxicidad conocida, pueden ser investigados. Los efectos tóxicos de los nuevos fármacos que se utilizarán en el cribado de la librería de sustracción también se pueden evaluar fácilmente mediante los procedimientos aquí descritos. Ejemplos de estos anticuerpos incluyen, por ejemplo, bomba anti-protones H⁺/K⁺ ATPase (riñón, Panvera Corporation), anti-LMC2 e isoenzima inducible de anti-dioxinas LM4B de citocromo P-450 (riñón e hígado), tal como se describió previamente (Buchman et al, Toxicol. Appl. Pharmacol. 123:160-69 (1993)); anti-glutathione S-transferasa (riñón, hígado, Panvera Corporation).

20 2. Identificación de genes específicos de órganos implicados en las respuestas de toxicidad de los compuestos usando técnicas de librería sustractiva

- [0249]** Como procedimiento de predicción de la toxicidad del fármaco, una prueba de toxicidad de múltiples parámetros sería muy valiosa y útil. Los experimentos de librería sustractiva son útiles en el desarrollo de este enfoque. Dicha metodología permite la identificación de genes que se expresan diferencialmente en un órgano diana como consecuencia de la exposición a sustancias químicas/fármacos. En la actualidad, los genes/rutas involucradas en la respuesta de toxicidad de los medicamentos/productos químicos y la activación metabólica de fármacos/productos químicos son difíciles de analizar debido principalmente a la falta de sondas y sustratos disponibles. Información adicional sobre la toxicidad en los órganos de fármacos se puede obtener mediante el aislamiento de nuevos genes en el animal (por ejemplo, teleósteo), utilizando el procedimiento de librería de sustracción. Los genes son clonados, los perfiles de expresión de los genes son evaluados, y su importancia como marcadores de toxicidad es comparada con los datos obtenidos previamente en los mamíferos.

A. Técnicas de librería sustractiva

- [0250]** Los genes que se expresan diferencialmente en un órgano diana como consecuencia de la exposición al fármaco/producto químico se pueden identificar mediante el uso de técnicas de librería de sustracción de la siguiente manera. El uso de compuestos seleccionados de nuestro LC50 y los procedimientos de toxicidad de órganos y los análisis descritos anteriormente, embriones de pez cebra son tratados para inducir toxicidad en los órganos. En diferentes momentos durante el tratamiento con fármacos, el hígado y/o riñón (tratados y controles) son disecados. Este material se utiliza para preparar las librerías de sustracción para aislar nuevos genes expresados diferencialmente en los embriones tratados y de control. Las técnicas de librería sustractiva (por ejemplo, Clontech, Palo Alto, CA) se utilizan para aislar genes selectivamente. El sistema Clontech PCR-Select utiliza la supresión de PCR y sólo requiere de una ronda de hibridación sustractiva para restar e igualar los ADNcs. Además, la técnica requiere cantidades muy pequeñas de ARN poli A+ preparado a partir de dos tipos de tejido que se quiere comparar, normalmente 0,5-2,0 mg. Recientemente, esta técnica se utilizó para aislar varios genes regulados por cafeína de la línea de células pre-B 1-8, incluyendo IGF-1B, y un homólogo predicho del antígeno de células asesinas naturales, NKR-P1 (Hubank y Schatz, Nucleic Acids Res. 22:5640-5648 (1994)).

- 45 **[0251]** Los genes identificados mediante la técnica de librería de sustracción son seleccionados, y el patrón de expresión de estos genes en los embriones durante la exposición al compuesto/fármaco puede ser evaluado. El patrón de expresión se puede comparar con el patrón encontrado en los mamíferos homólogos en condiciones similares. Los genes que sirven como "buenos" indicadores o marcadores de toxicidad (por ejemplo, toxicidad en los órganos) pueden ser identificados y seleccionados.

50 B. Teleósteos transgénicos

- [0252]** Las regiones adecuadas de regulación aguas arriba de los genes diana con la respuesta de valor predictivo de toxicidad pueden ser utilizadas para la construcción de los teleósteos transgénicos (por ejemplo, el pez cebra) con genes reporteros. La región 5' aguas arriba de estos genes se analiza para utilizar la zona de regulación para controlar la expresión de genes reporteros en el pez cebra transgénico. En este enfoque, los genes aislados mediante técnicas de librería de sustracción se utilizan para analizar la región 5' de regulación. Para la construcción de plásmidos portadores de un gen, tal como la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el control de las regiones reguladoras, se emplean regiones reguladoras que están aguas arriba de tamaño adecuado (1 o 2 kilobases) y perfil de expresión.

Estos plásmidos se utilizan para producir peces transgénicos tal como se describe en Long et al., Development 124:4105-4111 (1997). Por ejemplo, como los peces cebra son transparentes, las células de pez cebra transgénico que expresan GFP (un gen reportero en órganos y tejidos específicos) se puede detectar *in vivo* utilizando estándares de fluorescencia basados en técnicas de detección; en concreto, cuando las células que expresan GFP se iluminan con luz azul o ultravioleta (UV), se observa una brillante fluorescencia verde. La luz estimulada mediante técnica de fluorescencia de GFP no requiere cofactores, sustratos y productos adicionales de genes y, por lo tanto, se pueden realizar cribados *in vivo*, y usando los mismos embriones, los efectos de la toxicidad pueden ser monitorizados a lo largo del tiempo utilizando, por ejemplo, un lector de placas de fluorescencia. Usando este procedimiento de detección, muchos genes implicados en una respuesta a los fármacos que de otro modo sería difícil de ensayo se pueden evaluar fácilmente.

C. Micropatrones de ADNc de pez cebra

[0253] La tecnología de micropatrones de ADNc se puede utilizar para el perfil de combinaciones complejas de la expresión génica en respuesta a la toxicidad a los fármacos y los fenómenos de activación metabólica. La expresión del gen de la toxicidad específica de órganos puede ser monitorizada utilizando un micropatrón de genes de pez cebra aislados seleccionados mediante técnicas de librería de sustracción discutidas anteriormente y otras fuentes de genes. Los patrones de ADNc son simples y permiten una lectura directa de los resultados de la hibridación, por lo que constituyen una técnica ideal para el estudio de patrones de expresión génica en los tejidos sometidos a tratamiento de fármacos en momentos diferentes (Heller et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:2150-2155 (1997)).

D. Automatización de cribado

[0254] La metodología de múltiples parámetros descrita anteriormente se puede automatizar usando instrumentación estándar y programas de ordenador, permitiendo el cribado de cientos de compuestos a la semana. El cribado de embriones de teleósteos se puede realizar en placas de cultivo de múltiples 96 pocillos que contienen embriones fertilizados. En cuanto a otros procedimientos de cribado mencionados anteriormente, como normalmente los embriones de teleósteos se desarrollan en 100 µl de agua, los compuestos y los tintes se pueden añadir fácilmente al medio. Por otra parte, como los embriones de teleósteos transparentes se vuelven opacos cuando mueren, la letalidad embrionaria es comparativamente directa mediante un lector de placas de microtitulación estándar para calcular el LC50. Para la toxicidad en los órganos, como los ensayos de micropatrones de ADNc son cuantitativos (en color o fluorescencia) con buenos límites de confianza, y el pez cebra transgénico GFP se puede controlar a lo largo del tiempo, el formato de lector de placa de múltiples pocillos (por ejemplo, para 96 pocillos o cualquier otro número de múltiples pozos) se puede utilizar.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de cribado de un agente para una actividad, comprendiendo el procedimiento:
cultivar un teleósteo en una solución en un pocillo de una microplaca;
añadir el agente a la solución, con lo que el agente impregna el teleósteo; y
- 5 determinar si el agente tiene la actividad en el teleósteo.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el agente se añade a una solución que contiene el teleósteo.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el agente primero se disuelve en la solución y el teleósteo posteriormente se sumerge en la solución que contiene el agente.
- 10 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente se administra al teleósteo en conjunción con al menos otro compuesto.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende el uso de los instrumentos automatizados de manipulación de líquidos.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que una pluralidad de agentes son cribado para la actividad.
- 15 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que una librería de agentes se criba para la actividad.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que un lector de microplacas se utiliza para detectar una señal de la microplaca.
- 20 9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el teleósteo es un embrión de teleósteo completo.
10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que también comprende la administración de un tinte al teleósteo, en el que el tinte se utiliza para la detección de una respuesta en el teleósteo que indica la actividad.
11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que una señal para la detección de la actividad se genera mediante la tinción de anticuerpos de una proteína específica.
- 25 12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que una señal para la detección de la actividad se genera mediante hibridación *in situ*.
13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el pocillo contiene un único embrión de teleósteo.
- 30 14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que también el pocillo contiene múltiples embriones de teleosteos.
15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el teleósteo es un pez cebra.
16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el teleósteo es un embrión.
17. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el teleósteo es una larva o un adulto.
- 35 18. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que también comprende la evaluación de si el agente tiene una actividad tóxica en el teleósteo.
19. Procedimiento según la reivindicación 18, en el que la actividad tóxica se evalúa en uno o más órganos, por ejemplo, el riñón, páncreas, sistema cardiovascular, sistema nervioso central, o el hígado del teleósteo, simultáneamente o de forma independiente.
- 40 20. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la actividad del agente se criba para una capacidad de aumentar o inhibir la angiogénesis.
21. Procedimiento según la reivindicación 18-20, en el que el procedimiento también comprende la evaluación de si el agente aumenta o inhibe la muerte celular en el teleósteo.
22. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el teleósteo se cultiva en un volumen de solución tan pequeño como 100 µl.
- 45 23. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el teleósteo se cultiva en un volumen de solución de 500 µl.

24. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el teleósteo es un teleósteo mutante o transgénico.
25. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el agente es una molécula pequeña.
- 5 26. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente es un ácido nucleico, opcionalmente ADN o ARN, un péptido, una proteína, glicoproteína, carbohidrato, lípidos o glicolípido.
27. Procedimiento según la reivindicación 18, que también comprende la inspección visual del teleósteo para viabilidad, graves defectos morfológicos, ritmo cardíaco y circulación.
- 10 28. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que los embriones de teleósteos a las 24 horas de desarrollo con corion están expuestos continuamente durante cinco días a los compuestos químicos a diferentes concentraciones de los compuestos químicos y controles.
29. Utilización de una placa de microtitulación e instrumentación automatizada para el cribado de un agente para la actividad en un pez cebra.

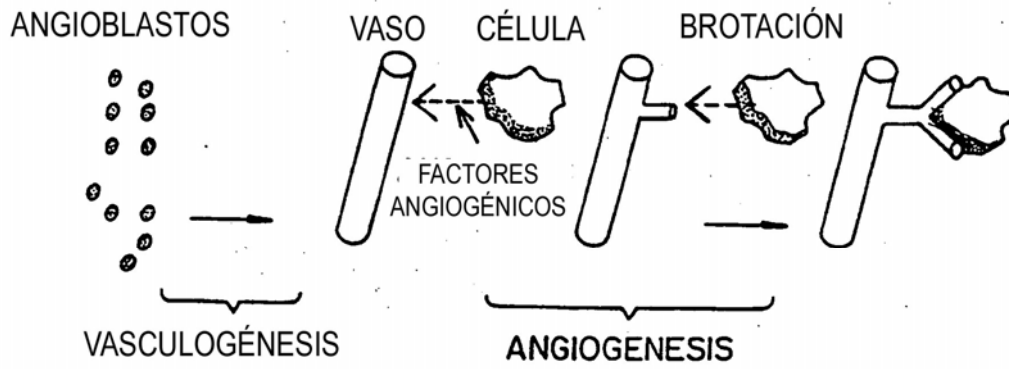


FIG. 1.

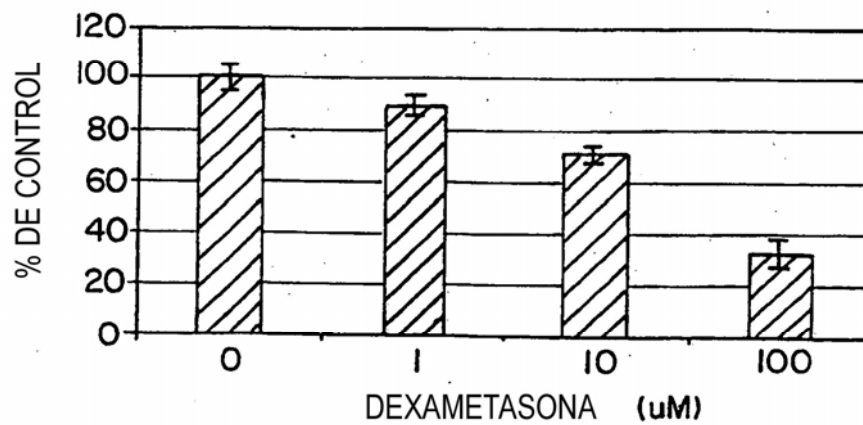


FIG. 13.

FIG. 2A.

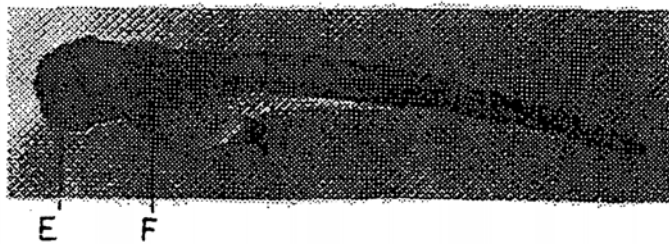


FIG. 2B.

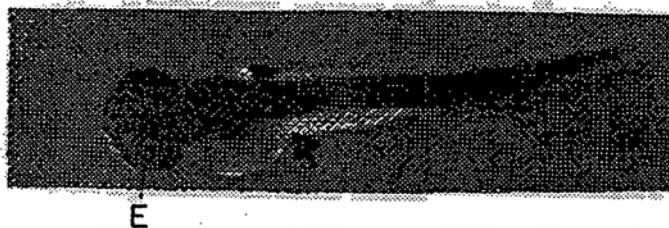


FIG. 2C.

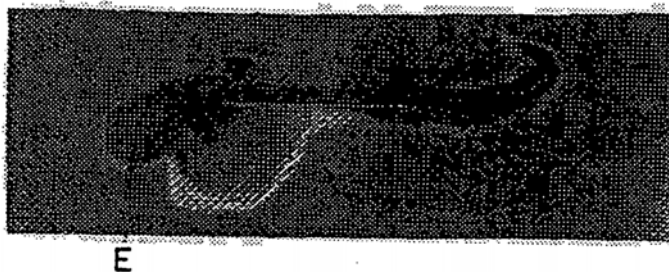


FIG. 3A.

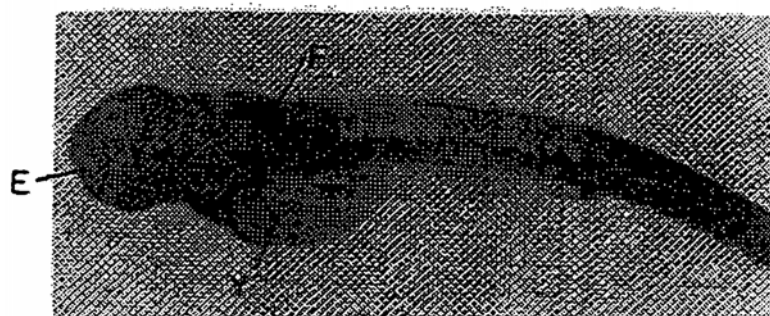


FIG. 3B.

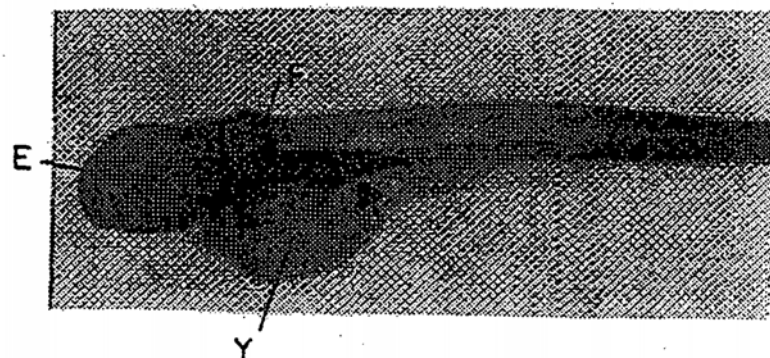


FIG. 4.

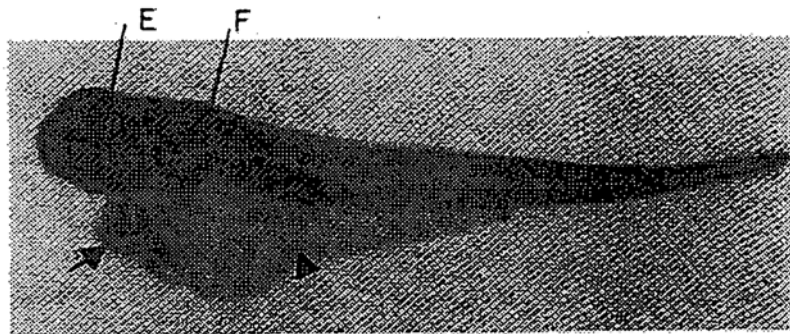


FIG. 5.



FIG. 6A.



FIG. 6B.



FIG. 6C.



FIG. 6D.



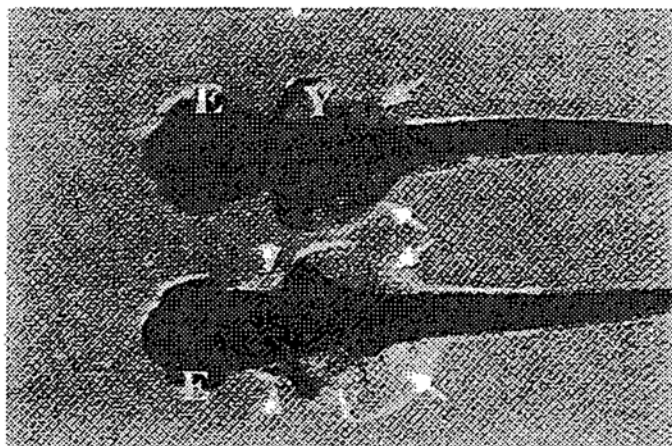


FIG. 7.

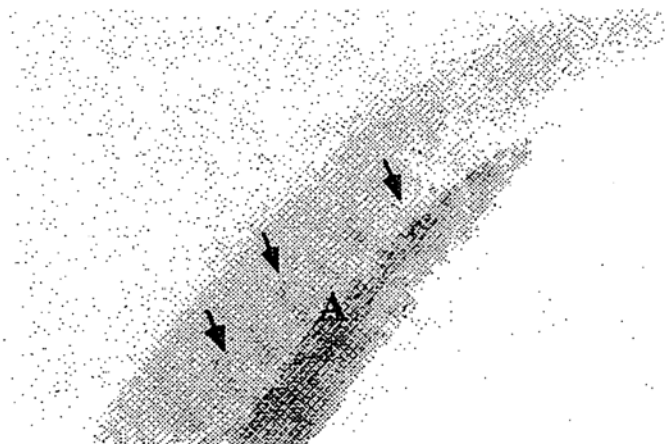


FIG. 8.

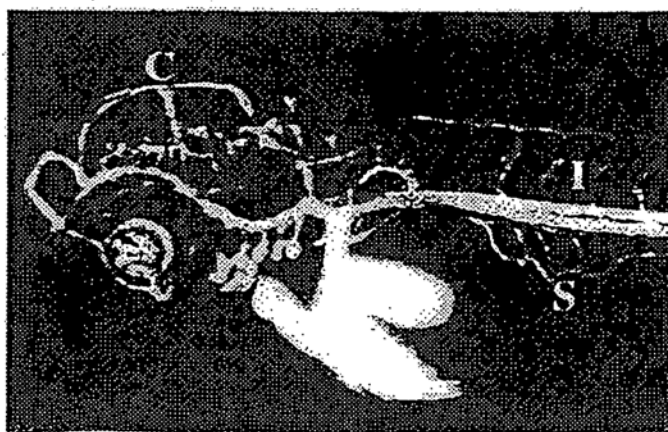


FIG. 9.

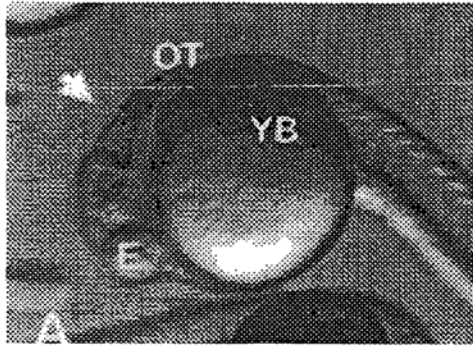


FIG. 10A.

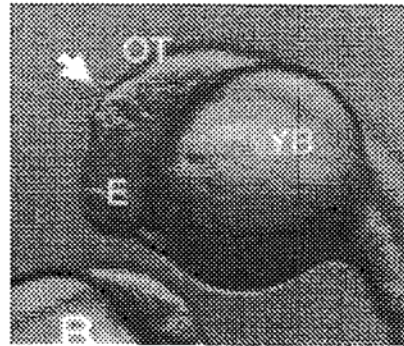


FIG. 10B.

FIG. 11.

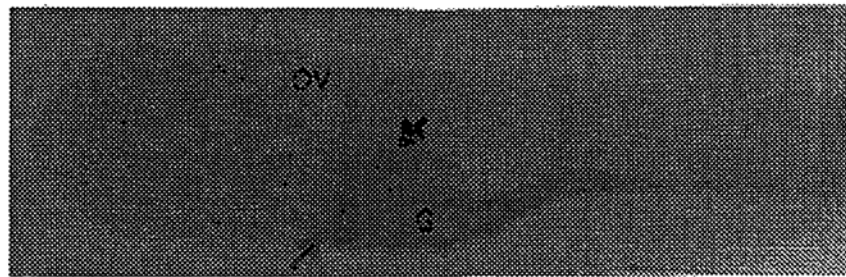


FIG. 12A.



FIG. 12B.

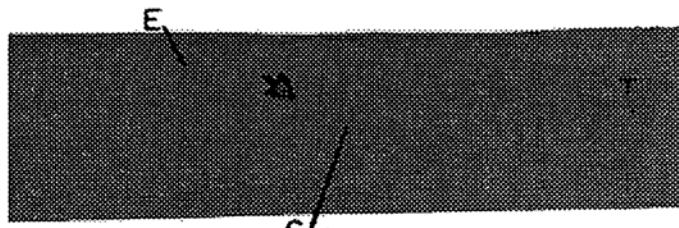


FIG. 14.

