

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 383**

51 Int. Cl.:
G01N 33/53 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06722440 .2**
96 Fecha de presentación: **11.05.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1912066**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.04.2008**

54 Título: **MÉTODO AUXILIAR PARA DIAGNOSIS Y TERAPIA DE CÁNCER CON NUCLEOLINA.**

30 Prioridad:
12.05.2005 CN 200510011707

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.11.2011

73 Titular/es:
**TSINGHUA UNIVERSITY
NO. 1 QINGHUA YUAN
HAIDIAN DISTRICT, BEIJING 1000, CN y
PROTGEN LTD.**

72 Inventor/es:
**LUO, Yongzhang;
SHI, Hubing y
ZHANG, Zhuobing,**

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

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).

ES 2 369 383 T3

DESCRIPCIÓN

Método auxiliar para diagnóstico y terapia de cáncer con nucleolina.

Campo de la invención

- La presente invención se refiere a un nuevo método para identificar sujetos con cáncer, en particular, pacientes humanos, que son candidatos adecuados para el tratamiento antiangiogénico contra el cáncer. La presente invención también se refiere a una nueva estrategia para buscar y detectar inhibidores de la angiogénesis, moléculas que se cree que son eficaces para reducir el crecimiento maligno de las células, particularmente en las neoplasias malignas que son dependientes de la angiogénesis. La presente invención describe métodos para detectar selectivamente inhibidores de la angiogénesis utilizando la molécula nucleolina (NL). En particular, la presente invención se refiere a la detección selectiva de inhibidores de la angiogénesis que funcionan de un modo que es análogo al de la proteína endoestatina (ES). La invención se basa en el descubrimiento de que la nucleolina es un receptor específico de la endoestatina y de que está implicado en la vía de la transducción de señales relacionada con la inhibición de la angiogénesis debida a la endoestatina.

Descripción de la técnica relacionada

- Recientemente se ha desarrollado un nuevo método para tratar el cáncer en el cual se inhibe la angiogénesis cancerosa mediante la endoestatina, se bloquea el riego sanguíneo del tumor y, por lo tanto, se reprime el crecimiento del mismo. La endoestatina (citada en la presente memoria como «ES») es un dominio globular de 20 kDa del extremo carboxilo del colágeno XVIII, una proteína de tipo colágeno. Originalmente se aisló del sobrenadante de una línea celular cultivada de hemangioendoteloma murino por su capacidad para inhibir la proliferación de las células endoteliales capilares. En los ensayos con animales se indujo la dormencia del tumor después de varios ciclos de tratamiento con ES sin ninguna resistencia a los fármacos. Además, se observó que la toxicidad de la ES era baja en las pruebas con animales y en los ensayos clínicos. La ES muestra una actividad potente a la hora de inhibir la proliferación, migración, adhesión y supervivencia de las células endoteliales, y a la hora de inducir la apoptosis celular. Aunque se sospecha que las integrinas, tropomiosina, glipicanos y selectina E son receptores de la ES asociados a la migración celular, y que la β -catenina y el adaptador Shb están implicados en la parada en G1 y en la apoptosis de las células endoteliales inducidas por la ES, todavía se debate el mecanismo molecular exacto de la ES, y sigue sin conocerse la razón de la poca toxicidad de la ES en las pruebas con animales y en los ensayos clínicos. Además, todavía falta una explicación adecuada del hecho de que se requiera una concentración elevada de ES para conseguir el efecto antitumoral en las pruebas con animales y en los ensayos clínicos.

- En el contexto del tratamiento del cáncer con endoestatina, se ha alabado que la ES sea un tratamiento eficaz contra el cáncer porque se dedica a acabar con las células cancerosas mediante la inhibición de la angiogénesis, un proceso que las células cancerosas requieren para formar metástasis. Cada aumento en la población de células tumorales debe ir precedido de un aumento de nuevos capilares que convergen en el tumor. Este fenómeno es casi universal; la mayoría de los tumores sólidos humanos y de las neoplasias malignas hematopoyéticas dependen de la angiogénesis. Otras ventajas del tratamiento antiangiogénico incluyen la poca toxicidad, la resistencia farmacológica mínima y que la repetición de los ciclos de tratamiento antiangiogénico pueden ir seguidos por una dormencia prolongada del tumor sin más tratamiento. Véase Boehm et al., «Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance». *Nature* (1997) 390: 404-407. Sin embargo, hasta la fecha todavía no está claro el modo de acción por el que actúa la ES. Por consiguiente, el tratamiento con la ES se está aplicando a los pacientes con cáncer indiscriminadamente, sin hacer referencia a la sensibilidad del paciente al tratamiento. Además, los investigadores encontraron que para conseguir el efecto esperado contra el cáncer mediante la función inhibidora de la angiogénesis que tiene la ES, se tiene que inyectar una gran cantidad de ES en los mamíferos portadores de cáncer, en particular en los seres humanos. Como se necesita una gran cantidad de ES, el precio alcanza un valor inaccesiblemente caro. Por consiguiente, hay una necesidad urgente de descubrir nuevos inhibidores de la neoangiogénesis económicos y eficaces para su uso en el tratamiento contra el cáncer. Se han llevado a cabo numerosos ensayos clínicos con la esperanza de encontrar un fármaco antiangiogénico eficaz. Sería un progreso significativo si los pacientes se pueden seleccionar utilizando criterios objetivos de modo que se puedan tratar con más eficacia con la ES.

- La eficacia del tratamiento del cáncer puede variar enormemente entre los pacientes tratados dependiendo de muchos factores, tanto externos como internos. Los factores externos incluyen las diferentes etapas del cáncer en el momento del tratamiento, donde la detección temprana es clave para un tratamiento y recuperación eficaces, la fuerza relevante del tratamiento del cáncer, como cirugía, quimioterapia o radioterapia. Los factores internos incluyen la salud del sistema inmunitario del paciente, en el cual un sistema fuerte puede sostener una posología de tratamiento más larga y potente y, por lo tanto, ayuda a que el paciente se recupere más rápido. Una cuestión clave que se está comenzando a explorar en el tratamiento del cáncer, y en la medicina en general, es lo que se denomina medicina personalizada. La noción de que diferentes individuos pueden tener diferentes tolerancia y sensibilidad al mismo fármaco o tratamiento contra el cáncer ha inspirado una gran parte de las estrategias en un intento por aumentar la eficacia de un tratamiento contra un cáncer en particular. Por lo tanto, debido a variaciones individuales, un fármaco que es eficaz en un paciente puede no serlo en otro. En el terreno del tratamiento del cáncer, se ha

intentado utilizar un perfil génico para entender si un fármaco determinado puede ejercer su función terapéutica con eficacia en un paciente con un perfil genético particular. Para entender la aplicación individualizada del tratamiento con ES, recientemente se han intentado utilizar las micromatrices de genes para estudiar el perfil de expresión génica que subyace a los efectos inhibidores de la ES sobre la angiogénesis de las células endoteliales. Véase M.

5 Mazzanti et al., *Genome Research*, 14: 1585-1593 (2004).

La NL es una proteína no histónica ubicua que se aisló por primera vez del nucléolo. Resulta muy interesante que la cantidad de NL esté correlacionada con la proliferación celular, que está regulada por la granzima A y la actividad de auto-escisión. La nucleolina también sufre la autoescisión, que disminuye cuando las células entran en una etapa proliferativa así como cuando se escinde por la granzima A, una esterasa secretada por los linfocitos citotóxicos (Chen et al., *J. Biol. Chem.*, 1991, 266, 7754-7758; Fang y Yeh, *Exp. Cell. Res.*, 1993, 208, 48-53; Pasternack et al., *J. Biol. Chem.*, 1991, 266, 14703-14708). La escisión y la degradación concomitante de la proteína proporciona la regulación postraduccional de la nucleolina.

Como proteína multifuncional, la NL ejerce un efecto crítico y fundamental sobre la proliferación celular, que incluye la organización de la cromatina nucleolar, el empaquetamiento del ARN precursor, la transcripción del ADN y el ensamblaje del ribosoma. Estas actividades están reguladas por determinadas proteínas cinasas, tales como la caseína cinasa 2 (CK2) y la cdc2, que están bajo el control estricto de otras proteínas del ciclo celular. Además, la NL también funciona como un receptor de la superficie celular, transbordando entre la superficie celular, el citoplasma y el núcleo. Como receptor de muchos virus y citocinas, la NL desencadena la interiorización de los ligandos tan pronto como estos ligandos se unen a ella.

20 La nucleolina ha sido descrita por Orrik et al (1973) como una proteína con una masa molecular de unos 100 a 110 kDa y existe principalmente en el núcleo de las células en propagación. La nucleolina es capaz de autodegradarse y proporcionar dos bandas de degradación de unos 70 y 50 kDa en el análisis de inmunotransferencia. La nucleolina está muy fosforilada y metilada, y puede estar ADP-ribosilada. Como la síntesis de la nucleolina está correlacionada positivamente con un aumento de la tasa de división celular, las células tumorales y las células que se dividen rápidamente tienen una concentración de nucleolina más elevada. La secuencia de la NL se describió por primera vez en Srivastava et al., «Cloning and sequencing of the human nucleolin cDNA». *FEBS Lett.* 250 (1), 99-105 (1989).

La nucleolina (también conocida como P92 y C23) es la fosfoproteína nucleolar más abundante en las células que crecen activamente (Srivastava et al., *FEBS Lett.*, 1989, 250, 99-105; Srivastava et al., *J. Biol. Chem.*, 1990, 265, 14922-14931). Ha sido descrita por varios grupos y se ha demostrado que participa principalmente en la biogénesis del ribosoma (Ghisolfi et al., *Mol. Biol. Rep.*, 1990, 14, 113-114; Sipos y Olson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1991, 177, 673-678) y en el transporte de los componentes ribosómicos (Schmidt-Zachmann et al., *Cell*, 1993, 74, 493-504). La nucleolina contribuye a la biosíntesis del ribosoma uniéndose transitoriamente a los precursores de los ribosomas en el nucléolo a través de una secuencia consenso de la ribonucleoproteína (Bugler et al., *J. Biol. Chem.*, 1987, 262, 10922-10925; Ghisolfi-Nieto et al., *J. Mol. Biol.*, 1996, 260, 34-53; Sapp et al., *Eur. J. Biochem.*, 1989, 179, 541-548). Aquí, la nucleolina puede representar hasta el 5% de la proteína nucleolar total (Lapyre et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1987, 84, 1472-1476; Sapp et al., *Eur. J. Biochem.*, 1989, 179, 541-548). No obstante, también se ha demostrado que interviene en la citocinesis, la nucleogénesis, la proliferación y el crecimiento celulares, la represión transcripcional, la replicación, la transducción de señales y la descondensación de la cromatina, revisado en (Tuteja y Tuteja, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1998, 33, 407-436).

La multifuncionalidad de esta proteína surge de la presencia de distintos dominios funcionales y estructurales dentro de la misma (Creancier et al., *Mol. Biol. Cell.*, 1993, 4, 1239-1250; Sapp et al., *Eur. J. Biochem.*, 1989, 179, 541-548). Se han descrito tres dominios dentro de la proteína nucleolina, el dominio del extremo amino, el dominio central y el dominio del extremo carboxilo. En el dominio del extremo amino aparece la secuencia que muestra homología con un grupo de movilidad elevada (HMG) y son responsables de las interacciones con la cromatina (Erard et al., *Eur. J. Biochem.*, 1988, 175, 525-530). El dominio central contiene cuatro motivos de reconocimiento de ARN y se une específicamente a una pequeña horquilla de los ARN ribosómicos 18S y 28S (Bugler et al., *J. Biol. Chem.*, 1987, 262, 10922-10925), mientras que el dominio del extremo carboxilo contiene regiones que son capaces de desapilar las bases del ARN (Ghisolfi et al., *Mol. Biol. Rep.*, 1990, 14, 113-114; Ghisolfi-Nieto et al., *J. Mol. Biol.*, 1996, 260, 34-53). La nucleolina contiene una señal de localización nuclear bipartita, que se extiende por el extremo amino y las regiones centrales de la proteína, lo que facilita el transporte al núcleo, donde la nucleolina se acumula debido a las interacciones con otras proteínas (Schmidt-Zachmann y Ningg, *J. Cell Sci.*, 1993, 105, 799-806).

La estructura del dominio de la nucleolina ha conducido a clasificar la proteína como una proteína Ag-NOR (gen ribosómico activo localizado en la región del organizador nucleolar), que en otro momento se conocía como marcadores de los genes ribosómicos activos (Roussel et al., *Exp. Cell. Res.*, 1992, 203, 259-269). Se ha demostrado que la transcripción de los genes ribosómicos requiere la presencia de proteínas Ag-NOR, y la expresión de las proteínas Ag-NOR se ha asociado con la predicción de la tasa de crecimiento tumoral en las neoplasias malignas.

La nucleolina también se ha purificado como una proteína de unión a la región de adhesión de la matriz (RAM) de las células de la eritroleucemia humana. En estos estudios se demostró que la nucleolina participaba en el anclaje

de los bucles de cromatina a la matriz nuclear (Dickinson y Kohwi-Shigematsu, *Mol. Cell. Biol.* 1995, 15, 456-465).

La nucleolina está muy fosforilada y se ha demostrado que es un sustrato para la caseína cinasa II (Csermely et al., *J. Biol. Chem.*, 1993, 268, 9747-9752; Schneider e Issinger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1988, 156, 1390-1397), proteína cinasa C- α (Zhou et al., *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 31130-31137) y Cdc2 (Belenguer et al., *Mol. Cell. Biol.* 1990, 10, 3607-3618). Además, se ha demostrado que la fosforilación de la nucleolina regula la localización subcelular de la proteína.

La nucleolina también sufre una autoescisión, que disminuye cuando las células entran en una etapa proliferativa, y también se escinde por la granzima A, una esterasa secretada por los linfocitos citotóxicos (Chen et al., *J. Biol. Chem.*, 1991, 266, 7754-7758; Fang y Yeh, *Exp. Cell. Res.*, 1993, 208, 48-53; Pasternack et al., *J. Biol. Chem.*, 1991, 266, 14703-14708). La escisión y la degradación concomitante de la proteína proporciona la regulación postraduccional de la nucleolina.

Se han encontrado anticuerpos antinucleolina en el suero de pacientes con enfermedades sistémicas del tejido conjuntivo que incluyen el lupus eritematoso diseminado (LED) (Minota et al., *J. Immunol.*, 1990, 144, 1263-1269; Minota et al., *J. Immunol.*, 1991, 146, 2249-2252) y la enfermedad de injerto contra huésped crónica de tipo esclerodermia (Bell et al., *Br. J. Dermatol.*, 1996, 134, 848-854). Por lo tanto, la modulación farmacológica de la expresión de la nucleolina puede ser un punto adecuado de intervención terapéutica en las afecciones patológicas.

La patente de los EE.UU. n.º 2005/053607 describe una matriz diagnóstica y un kit para la detección de la nucleolina sobre la superficie celular y diferentes muestras como, p. ej., sangre. La matriz y el kit comprenden una sonda (p. ej., un anticuerpo antinucleolina) para la nucleolina.

- 20 La patente de los EE.UU. n.º 2004/186056 describe anticuerpos antinucleolina como moléculas encauzadoras unidas a un quimioterápico antineoplásico, a un agente citotóxico, a un agente antiangiogénico, etc., para que actúen selectivamente sobre las células endoteliales tumorales, lo que impide la angiogénesis tumoral y/o destruye las células precursoras del endotelio.

COMPENDIO DE LA INVENCION

- 25 También se describe en la presente memoria un kit para determinar la sensibilidad de un sujeto al tratamiento contra el cáncer con endoestatina, que comprende una molécula marcadora que marca la nucleolina e instrucciones de uso para realizar una detección selectiva de una muestra de dicho sujeto con dicha molécula marcadora, de tal forma que se determina la cantidad de nucleolina presente en la muestra. Preferentemente, el sujeto es un mamífero. Más preferentemente, el sujeto es un humano. La nucleolina a marcar es la nucleolina de la superficie celular.
- 30 molécula marcadora comprende un anticuerpo, preferentemente un anticuerpo policlonal y, más preferentemente, un anticuerpo monoclonal. La molécula marcadora comprende una molécula de ácido nucleico, o sonda, preferentemente una sonda de ADN y aún más preferentemente, una sonda de ARN.

- La presente invención da a conocer un método para determinar en un sujeto la probabilidad de éxito del tratamiento contra el cáncer con endoestatina, que comprende detectar en una muestra de dicho sujeto el nivel de expresión de la nucleolina y determinar si dicho sujeto es sensible al tratamiento contra el cáncer con endoestatina basándose en la cantidad de expresión de la nucleolina.
- 35

- La presente invención da a conocer métodos para detectar selectivamente inhibidores de la angiogénesis, en particular, moléculas que funcionan de una manera similar a la endoestatina. La invención da a conocer métodos para utilizar la nucleolina, citada en la presente memoria como «NL», como una molécula diana, aplicando metodologías convencionales, las moléculas candidatas se pueden examinar para descubrir las moléculas que se unen específicamente a la NL y, al mismo tiempo, muestran actividad angiogénica. Debido al hecho de que la NL es un receptor de la superficie celular específico para la endoestatina, las nuevas moléculas descubiertas de este modo y que se describen más arriba deben funcionar de modo similar a la endoestatina.
- 40

- También se describe un método para producir un inhibidor de la angiogénesis específico de la NL eficaz a la hora de inhibir la angiogénesis, que comprende: aplicar un ensayo de fijación apropiado a un conjunto de moléculas candidatas, por lo que se obtienen numerosas moléculas específicas de la NL; analizar cada una de las muchas moléculas específicas de la NL por su eficacia para inhibir la angiogénesis mediante un ensayo de antiangiogénesis; y seleccionar la molécula resultante específica de la NL que es eficaz a la hora de inhibir la angiogénesis, como se demostró mediante el ensayo para medir la capacidad antiangiogénica.
- 45

- También se describe un método para seleccionar un inhibidor de la angiogénesis que tiene la capacidad de inhibir la proliferación y/o migración endotelial cuando se añade a las células endoteliales en proliferación *in vitro*, que comprende las etapas de: utilizar un método farmacéuticamente aceptable para descubrir moléculas que interaccionan específicamente con la NL cuando es la molécula diana; en las moléculas obtenidas así de la etapa anterior, analizar su eficacia para inhibir la proliferación o migración de las células endoteliales; y recoger las moléculas obtenidas así que son eficaces a la hora de inhibir la proliferación o migración de las células endoteliales, en donde la eficacia de la función antiangiogénica de dicha molécula se compara con la de la endoestatina.
- 50
- 55

También se describe un método para potenciar la sensibilidad a la endoestatina que presentan las células endoteliales diana. Los métodos de la presente memoria dan a conocer cómo introducir moléculas de NL exógenas en las células endoteliales diana, de tal forma que las moléculas de NL se sobreexpresan en comparación con el nivel del tipo salvaje. Preferentemente, estas células diana son las que normalmente no expresan una gran cantidad de NL de forma endógena. Además, los métodos dan a conocer la introducción de la NL en las células endoteliales diana, de tal manera que la endoestatina puede acabar con eficacia con estas células modificadas debido a las propiedades angiogénicas de la endoestatina.

También se describen en la presente memoria anticuerpos contra las moléculas de NL, que se pueden utilizar para detectar células diana cancerosas (o células endoteliales) que tienen una gran cantidad de NL en la superficie y que son buenas candidatas para el tratamiento contra el cáncer con la ES.

También se describe un método para aumentar la receptividad de una célula diana a un inhibidor de la angiogénesis, que comprende: introducir la NL exógena en las células diana, con lo que se obtienen muchas células diana modificadas que expresan la NL exógena, y medir la tasa de destrucción de las células diana modificadas por la endoestatina.

También se describe un método para potenciar el efecto antiangiogénico de un inhibidor de la angiogénesis sobre una célula endotelial diana, que comprende introducir en dicha célula diana una cantidad farmacéuticamente eficaz de moléculas de NL exógena, siendo dicha molécula de NL capaz de expresarse en dicha célula diana; e incubar dicha célula diana con dicho inhibidor de la angiogénesis, lo que provoca la inhibición del crecimiento de dicha célula diana.

También se describe en la presente memoria un método para aumentar la eficacia de los inhibidores de la angiogénesis sobre el control del crecimiento de un cáncer en un paciente que tiene tal cáncer, que comprende identificar la presencia de la concentración de moléculas de NL endógenas en una muestra del cáncer de dicho paciente, utilizando los métodos aceptables; y determinar la susceptibilidad a la eficacia del inhibidor de la angiogénesis sobre dicho paciente con cáncer utilizando el nivel de expresión de la NL en dicho paciente, de manera que un mayor nivel de NL indica un mayor grado de éxito de tal tratamiento con el inhibidor de la angiogénesis. Preferentemente, el inhibidor de la angiogénesis es la endoestatina.

También se describe en la presente memoria un kit diagnóstico para ensayar la sensibilidad individual que las células diana tienen hacia los inhibidores de la angiogénesis, que comprende una molécula que se fija específicamente a una molécula de NL; y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, la molécula es un anticuerpo policlonal y, más preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

También se describe un método para identificar células diana cancerosas que son susceptibles a un tratamiento con el inhibidor antiangiogénico, que comprende generar un anticuerpo antinucleolina; utilizar dicho anticuerpo antinucleolina para rastrear una muestra de dichas células diana cancerosas; e identificar las células cancerosas diana sensibles al tratamiento con el inhibidor antiangiogénico tal y como se indicó mediante interacciones específicas entre las células diana del cáncer y el anticuerpo antinucleolina. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal y, más preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

También se describe en la presente memoria un kit diagnóstico para determinar las células diana cancerosas que son sensibles al tratamiento con el inhibidor antiangiogénico, que comprende un anticuerpo contra la nucleolina y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

También se describe en la presente memoria un kit diagnóstico para determinar y seleccionar sujetos con cáncer que son sensibles al tratamiento con el inhibidor antiangiogénico, que comprende una molécula marcadora que es capaz de unirse a la nucleolina e indicar su presencia, y una instrucción escrita para realizar una prueba de detección de una muestra del sujeto con cáncer de tal forma que se detecta el nivel de presencia de la nucleolina en la muestra.

También se describe en la presente memoria un método para inhibir la proliferación y/o migración de células endoteliales en una muestra de células, que comprende conjugar un anticuerpo antinucleolina a un agente citotóxico, obteniendo así el anticuerpo antinucleolina citotóxico, y aplicar el anticuerpo antinucleolina citotóxico a dicha muestra de células, por lo que se inhibe la proliferación y/o migración de determinadas células endoteliales. Preferentemente, dicho agente citotóxico es una citocina. Más preferentemente, dicho agente citotóxico es un factor de necrosis tumoral. Dicha muestra de células se obtiene de pacientes con cáncer.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **figura 1** muestra que las CEMH (células endoteliales microvasculares humanas) son una estirpe celular sensible, pues su migración y proliferación responden a la ES. **a**, Ensayo de migración celular realizado con CEMH en presencia de ES a las concentraciones que se han indicado, y el PBS sirve de control. **b**, El ensayo de proliferación celular de las CEMH se determinó en presencia de ES a las concentraciones que se han indicado, y el PBS sirve de control. El número de células se evaluó mediante un ensayo MTT. Los resultados son medias \pm EEM, $n = 3$ (**a**) y $n = 5$ (**b**).

La **figura 2** muestra que la ES se fija a la NL de la superficie celular. **a**, Las proteínas que se fijan a la ES que se aislaron de la superficie celular de las CEMH se identificó que eran NL y su fragmento. Las proteínas que se unen a la ES se aislaron de membrana plasmática de las CEMH utilizando perlas de afinidad ES-Ni-NTA como se describe en los métodos. La fracciones eluidas con cloruro de sodio a 500 mM en tampón PBS se aplicaron en SDS-PAGE (panel izquierdo) e inmunotransferencia utilizando anticuerpos monoclonales contra la NL (panel derecho). **b**, La ES se une específicamente a la NL *in vitro*. Se realizó la inmunoprecipitación con NL y ES recombinantes. **c**, La heparina interrumpe la formación del complejo ES-NL. La inmunoprecipitación con NL y ES recombinantes se llevó a cabo *in vitro* con o sin heparina (200 nM). **d**, La ES se une específicamente a las CEMH a través de las NL de la superficie. Las CEMH se incubaron con ES y diferentes concentraciones de anticuerpos contra la NL durante 30 min a TA, y luego se lavaron 3 veces con tampón PBS. Las células se aplicaron en SDS-PAGE e inmunotransferencia con anticuerpos contra la ES. Se utilizó la β -actina como control. **e**, Se incubaron las CEMH con ES (20 μ g/ml) durante diferentes plazos de tiempo a 37 °C y CO₂ al 5%. Después de lavar con medio nuevo, se llevaron a cabo la inmunoprecipitación y la inmunotransferencia con anticuerpos contra la NL y contra la ES, respectivamente. **f-i**, Colocalización de la NL y de la ES sobre la superficie de las células CEMH. Las células CEMH intactas se tiñeron con anticuerpo anti-NL de ratón y anticuerpo anti-ES de conejo. Se examinaron mediante inmunofluorescencia con microscopía confocal de barrido láser. Barra de escala: 20 μ m.

La **figura 3** muestra que la nucleolina es un receptor de la endoestatina. **a**, Se analizaron las concentraciones indicadas de NL recombinante para elevar la inhibición de la ES en el ensayo de migración de las CEVUH (células endoteliales de la vena umbilical humana), y el PBS sirve de control. **b**, La NL recombinante por sí misma no tiene ningún efecto sobre la migración celular. El ensayo de migración de las CEVUH se realizó con las concentraciones indicadas de ES, NL y ambas, respectivamente, y el PBS de control. **c**, Se realizó el ensayo de proliferación de las CEVUH con las concentraciones indicadas de ES, NL y anti-NL, y el PBS de control. Se evaluó el número de células con un ensayo MTT. **d**, Se realizó el ensayo de adhesión celular con CEVUH de control y deficientes en NL. Las células deficientes en NL se obtuvieron suprimiendo la expresión de NL con el plásmido para iARN BS/U6/1356. Las células de control se transfectaron con el plásmido blanco BS/U6. Los resultados son medias \pm EEM, n = 4 (**a**, **d**), n = 5 (**b**, **c**). **e**, La supresión de la expresión de la NL debida a los plásmidos para iARN se demostró mediante inmunotransferencia con anti-NL. El plásmido B6/U6/1356 puede suprimir la expresión de NL, pero la dosis de BS/U6/263 no lo consigue. Las transferencias de miosina sirven como controles de carga. **f**, Se realizó el ensayo de proliferación celular con CEVUH de control y deficientes en NL. Se obtuvieron células deficientes en NL suprimiendo la expresión de NL con el plásmido para iARN BS/U6/1356. Las células de control se transfectaron con el plásmido blanco pB6/U6. Se añadió la ES a las concentraciones indicadas. El número de células se evaluó con el ensayo de MTT.

La **figura 4** muestra que la nucleolina interviene en la red de señalización de la endoestatina. **a-f**, La ES se interioriza en las CEMH. Se incubaron las CEMH con o sin (**a**) ES biotinilada a 10 μ g/ml durante 0,5 h (**b**), 1 h (**c**), 2 h (**d**), 3 h (**e**), y 7 h (**f**), respectivamente. La ES interiorizada se tiñó con avidina marcada con TRITC. **g**, La ES interiorizada se bloqueó incubando las células con anti-NL. Barra de escala: 25 μ m. **h**, En el núcleo, la ES impide que CK2 fosforile la NL.

Se realizó el ensayo de fosforilación como se describe en Métodos. Se detectó la NL fosforilada mediante SDS-PAGE y autorradiografía. Las transferencias de NL sirven como controles de carga. **i-k**, Colocalización de la NL de la superficie celular con la integrina β 1 sobre la superficie de las CEMH. Se tiñeron las CEMH intactas con anti -NL de ratón y antiintegrina β 1 de conejo, y se detectaron mediante inmunofluorescencia indirecta utilizando microscopía confocal de barrido láser. Barra de escala: 10 μ m.

La **figura 5** muestra que la distribución de la nucleolina de la superficie celular depende del estado de crecimiento de las células. **a-h**, Distribución de la NL de la superficie celular en las CEMH. La NL de la superficie celular de las células en proliferación y de las células quiescentes se detectó mediante inmunofluorescencia indirecta utilizando anti-NL de conejo. El DAPI ilumina todas las células que aparecen en el campo. Barra de escala: 20 μ m. La etapa del ciclo celular de las células en proliferación (**g**) y de las células quiescentes (**h**) se detectó mediante citometría de flujo, respectivamente. Se obtuvieron células relativamente quiescentes mediante ayuno de suero durante 24 h. **i-l**, Distribución de la NL de la superficie celular en ratones atímicos portadores de tumor. Se realizó la inmunohistoquímica como se describe en Métodos. Los vasos sanguíneos del corazón (**i**), riñón (**j**), pulmón (**k**) y tumor (**l**) se indicaron con flechas. Las células endoteliales, que contienen la NL en la superficie celular, se tiñeron de marrón. Barra de escala: 50 μ m.

La **figura 6** proporciona un modelo de trabajo para la red de señalización de la endoestatina mediada por la nucleolina. En la red de señalización de la ES interviene un gran complejo, que está compuesto por la NL de la superficie celular, la integrina (tal como la integrina α 5 β 1) y otras proteínas. La NL se fija a la miosina, que conecta la NL y los filamentos de la actina. Igualmente, la integrina se une indirectamente a los haces de filamentos de actina mediante las proteínas intracelulares de anclaje talima, -actinina, filamina y vinculina. No se observa ninguna interacción directa entre la NL y la integrina. La ES se fija a este complejo compitiendo con la MEC, lo que conduce a la disminución de la adhesión y de la migración celulares. Esta fijación también puede desencadenar la transducción de las señales en las que interviene la integrina. Por otra parte, este complejo puede intervenir en la interiorización de la ES, en la cual la miosina sirve de transportador.

Posteriormente, la ES se puede liberar en el citoplasma. Parte de la ES funciona como un inhibidor de la NL, lo que puede estabilizar el ARNm de Bcl-2, y ejercer otras funciones. La ES restante se transporta al núcleo, donde impide que la CK2 fosforile la NL, y también inhibe otros acontecimientos vía abajo.

La **figura 7** muestra la colocalización de la ES y la NL *in vivo*. A ratones portadores de tumores B16-F10 se les inyectaron por vía intravenosa la ES biotinilada y anticuerpos contra la NL. Se les inyectó como control ES biotinilada e IgG de conejo purificada. La distribución de la ES marcada con biotina y los anti-NL en corazón (**a-c**), hígado (**d-f**), riñón (**g-i**), tumor (**j-l**), y el tumor de control (**m-o**), se detectaron con avidina conjugada a TRITC y anticuerpos secundarios conjugados a FITC. Barra de escala: 50 μ m.

La **figura 8** muestra sensogramas de la cinética de fijación que representan interacciones en directo entre la ES y la NL a las concentraciones indicadas. El resultado muestra que la constante de afinidad (K_D) de la ES por la NL es de $2,32 \times 10^{-8}$ M.

La **figura 9** muestra el aumento de la actividad antiangiogénica de la ES con el aumento de la cantidad de NL en las células diana endoteliales. **a**, Se realizó la inmunotransferencia con anticuerpos anti-NL para comprobar la inhibición del plásmido para interferencia por ARN sobre la expresión de la NL. El BS/U6/1356 puede inhibir la expresión de la NL, mientras que BS/U6/263 y BS/U6/1356C no tienen el efecto. Se utilizó la actina como control de carga. **b**, Se realiza el ensayo de proliferación celular con CEMH de control y deficientes en NL. Las CEMH deficientes en NL se obtienen al inhibir la expresión de la NL mediante el método de iARN que utiliza el plásmido BS/U6/1356. Las células transfectadas mediante el plásmido BS/U6/1356C se utilizaron como control. La concentración de la ES añadida es de 10 μ g/ml. La cantidad de células se analizó mediante el método MTT.

20 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención deriva parcialmente del descubrimiento de que la nucleolina actúa como un receptor específico de la ES y facilita su función en la antiangiogénesis.

Actualmente, en el contexto del tratamiento del cáncer con endoestatina, se debería progresar considerablemente si fuera posible seleccionar los candidatos adecuados para la ES. Los métodos de la presente invención se pueden utilizar para conseguir este propósito.

Para investigar el mecanismo mediante el cual funciona la ES, el inventor utiliza ES inmovilizada para aislar las proteínas que son capaces de fijarse a la ES de las membranas de las CEMH. La NL es una de tales proteínas y se ha demostrado que es un miembro clave de la red de señalización de la ES. Se ha encontrado que la NL es el receptor de la ES y que interviene en la inhibición de la angiogénesis.

Basándose parcialmente en el descubrimiento anterior, a saber, que la NL es el receptor específico de la ES y participa en la inhibición de la angiogénesis de la ES, la presente invención da a conocer: (i) un método para determinar la probabilidad de éxito en un sujeto del tratamiento contra el cáncer con endoestatina; (ii) un método para producir un inhibidor de la angiogénesis específico de la NL eficaz a la hora de inhibir la angiogénesis; (iii) un método para seleccionar un inhibidor de la angiogénesis que tiene la capacidad de inhibir la proliferación y/o la migración endotelial *in vitro*; (iv) un método para aumentar la receptividad que una célula diana tiene por un inhibidor de la angiogénesis; (v) un método para mejorar el efecto antiangiogénico de un inhibidor de la angiogénesis en una célula diana endotelial; (vi) un método para identificar células diana cancerosas que son sensibles a un tratamiento inhibidor de la antiangiogénesis.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «endoestatina» (también conocida como «ES») se refiere a una proteína que tiene preferentemente de 18 kDa a 20 kDa de tamaño, según se determina mediante electroforesis en gel en condiciones reductoras y no reductoras, respectivamente. La terminología endoestatina también incluye formas precursoras de la proteína de 18 kDa a 20 kDa. La terminología endoestatina también incluye los fragmentos de la proteína de 18 kDa a 20 kDa y proteínas y péptidos modificados que tienen una secuencia de aminoácidos sustancialmente similar, y que son capaces de inhibir la proliferación de las células endoteliales. Por ejemplo, se conoce bien en la técnica las sustituciones silenciosas de aminoácidos, en donde el reemplazo de un aminoácido por otro aminoácido con una estructura o química similar no altera significativamente la estructura ni la conformación ni la actividad de la proteína. Tales sustituciones silenciosas se pretende que se encuentren dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Se apreciará que la terminología «endoestatina» incluye proteínas o péptidos más cortos en los que se han retirado uno o más aminoácidos de uno o ambos extremos de la endoestatina, o de una región interna de la proteína, mientras que la molécula resultante conserva la actividad inhibidora de la proliferación endotelial. La terminología «endoestatina» también incluye proteínas o péptidos más largos, en los que se han añadido uno más aminoácidos a uno o ambos extremos de la endoestatina, o en una localización interna en la proteína, mientras que la molécula resultante conserva la actividad inhibidora de la proliferación endotelial. Tales moléculas, por ejemplo con una tirosina añadida en la primera posición, son útiles para marcar, tal como la radioyodación con 125 I para uso en los ensayos. La marcación con otros radioisótopos puede resultar útil para proporcionar una herramienta molecular para destruir los receptores de la endoestatina que contienen las células diana.

Igualmente, tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «nucleolina» (también conocida como «NL») se refiere a una proteína que tiene preferentemente 100 kDa (la masa molecular exacta de 80 kDa es cuando no hay modificación posterior) de tamaño, tal y como se determina mediante electroforesis en gel reductor. La terminología nucleolina también incluye formas precursoras de la proteína de 100 kDa. La terminología nucleolina también incluye fragmentos de la proteína de 100 kDa y proteínas y péptidos modificados que tienen una secuencia de aminoácidos sustancialmente similar, y que son capaces de inhibir la proliferación de las células endoteliales. Por ejemplo, se conocen bien en la técnica sustituciones silenciosas de aminoácidos, en donde el reemplazo de un aminoácido por un aminoácido de estructura o química similar no altera significativamente la estructura ni la conformación ni la actividad de la proteína. Tales moléculas, por ejemplo con una tirosina añadida en la primera posición, son útiles para marcar, tal como la radioyodación con ¹²⁵I, para uso en los ensayos. Se pretende que tales sustituciones silenciosas se encuentren dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

La terminología «específico de NL» se refiere a la capacidad de fijación que tiene la NL a un inhibidor de la angiogénesis, y media su actividad inhibidora.

La terminología «dependiente de la angiogénesis» se refiere a las neoplasias malignas y tumores cuyo crecimiento o migración requiere la angiogénesis, que incluye los que requerirían, para su crecimiento en volumen o en masa, o ambos, un aumento del número y de la densidad de los vasos sanguíneos que les suministran la sangre.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «sujeto» se refiere a un animal, tal como un mamífero, que incluye, pero sin limitarse a ellos, un humano, un primate no humano, un roedor, un cerdo, un conejo, y similares, que tiene que recibir un tratamiento particular, o que se somete a un procedimiento particular, tal como el rastreo del nivel de presencia de una molécula particular.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «muestra» se utiliza en su sentido más amplio, que incluye, pero sin limitarse a ellas, una muestra biológica y una muestra medioambiental. En un sentido, significa que incluye un espécimen o cultivo obtenido de cualquier fuente, así como muestras biológicas y medioambientales. Las muestras biológicas se pueden obtener de animales (incluidos los humanos) y abarca líquidos, sólidos, tejidos y gases. Las muestras biológicas incluyen productos sanguíneos, tales como plasma, suero y similares. Las muestras medioambientales incluyen material medioambiental, tal como material de la superficie, suelo, agua, minerales, cristales y muestras industriales. Tales ejemplos no se interpretarán como limitantes de los tipos de muestras englobados por la presente invención.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «molécula marcadora» engloba las moléculas químicas o biológicas que se utilizan para detectar en una muestra la presencia de una molécula diana que es capaz de fijarse, o si no de interaccionar, con la molécula marcadora, de modo que indique su presencia en la muestra, y la cantidad de la molécula diana en la muestra. Ejemplos de tales moléculas marcadoras incluyen, pero sin limitarse a ellas, una sonda de ácido nucleico tal como una sonda de ADN o una sonda de ARN, un anticuerpo, un radioisótopo, un colorante fluorescente y similares.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «instrucción de uso» incluye las instrucciones del kit para realizar el procedimiento de detección de la presencia de una molécula diana, tal como la nucleolina, en la muestra a analizar.

Tal y como se utiliza en la presente invención, un ensayo de fijación apropiado para seleccionar el inhibidor de la angiogénesis específico relacionado con la NL incluye HPLC, inmunoprecipitación, ensayo de unión fluorescente, electroforesis capilar, etc.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, un «ensayo de antiangiogénesis» es un experimento en el cual se rastrean conjuntos de moléculas candidatas para descubrir la eficacia de las moléculas candidatas a la hora de inhibir la angiogénesis. Para descubrir si una molécula tiene una propiedad antiangiogénica, se pueden aplicar diferentes métodos para realizar la presente invención. Por ejemplo, proteínas y péptidos derivados de éstas y otras fuentes, que incluyen la síntesis de proteínas automática o manual, se les pueden analizar rápida y fácilmente la proliferación endotelial inhibiendo la actividad con el uso de un ensayo de actividad biológica, tal como el ensayo de proliferación de célula endoteliales capilares bovinas. Otros bioensayos para inhibir la actividad incluyen el ensayo de la membrana corioalantoica embrionaria de pollo (MCA), el ensayo corneal de ratón y el efecto de administrar proteínas aisladas o sintetizadas a tumores implantados. El ensayo de MCA de pollo se describe en O'Reilly et al en «Angiogenic Regulation of Metastatic Growth», *Cell*, vol. 79 (2), 21 de octubre, 1994, págs. 315-328. Otros ensayos antiangiogénicos para detectar selectivamente los inhibidores de la angiogénesis se pueden encontrar en Yu et al., *PNAS*, vol. 101, n.º 21, págs. 8005-8010 (2004).

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «y/o» tal y como se utiliza en la frase «proliferación y/o migración» se refiere a dos situaciones: 1) están moduladas tanto la proliferación como la migración de las células endoteliales, 2) está modulada o bien la proliferación o bien la migración de las células endoteliales, pero no ambas.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «conjugar» se refiere a conectar un anticuerpo a un agente citotóxico, tal como una molécula de citocina, utilizando técnicas convencionales, biológicas o químicas, bien conocidas, tales como entrecruzamiento, y similares.

Las moléculas de NL se pueden utilizar para generar anticuerpos monoclonales o policlonales, que a su vez se pueden utilizar para identificar y cuantificar la cantidad de NL en determinadas células diana. La NL marcada con los marcadores apropiados, tales como radioisótopos y colorante fluorescente, se pueden utilizar para la detección de la endoestatina en los tejidos y líquidos corporales con el propósito de diagnóstico o pronóstico de enfermedades dependientes de la angiogénesis, tal como el cáncer. También se describen en la presente memoria métodos para

tratar o prevenir enfermedades y procesos angiogénicos, que incluyen, pero sin limitarse a ellos, artritis y tumores, al aumentar en un paciente la eficacia de la endoestatina en las neoplasias malignas dependientes de la angiogénesis.

Los métodos tales como la citometría de flujo, así como las técnicas de inmunoensayo enzimático (ELISA), se pueden utilizar para la cuantificación del péptido NL.

- 10 La detección de las moléculas de ácido nucleico de la NL se puede realizar mediante técnicas de biología molecular estándares tales como la hibridación con sondas de ADN, PCR, etc. Las referencias generales para los métodos que se pueden utilizar para realizar los diferentes procedimientos de clonación y PCR descritos en la presente memoria se pueden encontrar en «Molecular Cloning: A Laboratory Manual» (Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab, publ. 198, última edición). La detección de las moléculas de ARN de NL se puede realizar mediante análisis de
- 15 transferencia Northern. El análisis de transferencia Northern implica la preparación de ARN y la hibridación de una sonda complementaria marcada. En algunas realizaciones, el ARN (o el correspondiente ADNc) se detecta por hibridación a una sonda oligonucleotídica. Están disponibles numerosos ensayos de hibridación que utilizan numerosas tecnologías para la hibridación y la detección. Por ejemplo, se utiliza el ensayo TaqMan (PE Biosystems, Foster City, Calif.; véase, p. ej., las patentes de los EE.UU. n.º 5 962 233 y 5 538 848). El ensayo se realiza durante
- 20 una reacción de PCR. El ensayo TaqMan explota la actividad exonucleasa de 5' a 3' de la ADN polimerasa AMPLITAQ GOLD. En la reacción de PCR se incluye una sonda que consiste en un oligonucleótido con un colorante indicador en 5' (p. ej., un colorante fluorescente) y un colorante extintor en 3'. Durante la PCR, si la sonda se une a su diana, la actividad nucleolítica de 5' a 3' de la polimerasa AMPLITAQ GOLD escinde la sonda entre el indicador y el extintor. La separación del colorante indicador del colorante extintor hace aumentar la fluorescencia. La señal se
- 25 acumula con cada ciclo de PCR y se puede monitorizar con un fluorímetro.

La PCR con retrotranscriptasa (RT-PCR) se puede utilizar para detectar la expresión del ARN. En la RT-PCR el ARN se convierte enzimáticamente en ADN complementario o «ADNc» mediante una enzima retrotranscriptasa. A continuación, el ADNc se utiliza como plantilla para una reacción de PCR. Los productos de la PCR se pueden detectar mediante cualquier método adecuado, que incluye, pero sin limitarse a ellos, la electroforesis en gel y la

- 30 tinción con un colorante específico de ADN, o la hibridación a una sonda marcada. Por ejemplo, se utiliza la PCR cuantitativa con retrotranscriptasa con mezclas estandarizadas del método de plantillas competitivas descrito en las patentes de los EE.UU. n.º 5 639 606, 5 643 765 y 5 876 978.
- La detección de la molécula de proteína NL se puede realizar mediante técnicas conocidas en la técnica (p. ej., radioinmunoensayo, ELISA [inmunoensayo enzimático], inmunoensayo de tipo sándwich, ensayos

- 35 inmunoradiométricos, reacciones de precipitación por difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos *in situ* [p. ej., mediante oro coloidal, marcaciones enzimáticas o radioisotópicas, por ejemplo], análisis de inmunotransferencia, reacciones de precipitación, ensayos de aglutinación [p. ej., ensayos de aglutinación en gel, ensayos de hemaglutinación, etc.], ensayos de fijación del complemento, ensayos de inmunofluorescencia, ensayos con proteína A y ensayos inmunolectroforéticos, etc.).

- 40 Por ejemplo, la unión al anticuerpo se detecta con la determinación de una molécula marcadora en el anticuerpo primario. En otra realización, el anticuerpo primario se detecta con la determinación de la fijación de un anticuerpo secundario o reactivo al anticuerpo primario. En otra realización, el anticuerpo secundario está marcado. Se conocen muchos métodos en la técnica para detectar la unión en un inmunoensayo y se encuentran dentro del alcance de la presente invención.

- 45 En algunos casos se utiliza un ensayo de detección automático. Los métodos para la automatización de los inmunoensayos incluyen los descritos en las patentes de los EE.UU. n.º 5 885 530, 4 981 785, 6 159 750 y 5 358 691. El análisis y la presentación de los resultados también se puede automatizar. Por ejemplo, se puede utilizar un programa informático que genera un pronóstico basándose en la presencia o ausencia de una serie de proteínas que corresponden a marcadores del cáncer.

- 50 Para modular los procesos dependientes de endotelio, tales como la reproducción, desarrollo, y cicatrización de heridas y reparación de tejido, se puede emplear el tratamiento pasivo con anticuerpos mediante el uso de anticuerpos que se unen específicamente a la NL. Además, se pueden utilizar anticuerpos anti-NL para seleccionar las células en las que abundan las moléculas de NL endógena, y por eso, esas células son unas buenas candidatas para el tratamiento con endoestatina.

- 55 Los anticuerpos específicos contra la NL y los análogos de la NL se generan según las técnicas y protocolos bien conocidos en la técnica. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. Los anticuerpos se utilizan en formatos de inmunoensayo bien conocidos, tales como inmunoensayos competitivos y no competitivos, incluido el ELISA, inmunoensayos de tipo sándwich y radioinmunoensayos (RIA), para determinar la presencia o ausencia de los inhibidores de proliferación endotelial de la presente invención en los líquidos corporales. Ejemplos de líquidos

corporales incluyen, pero sin limitarse a ellos, sangre, suero, líquido peritoneal, líquido pleural, líquido cerebroespinal, líquido uterino, saliva y moco.

También se describen en la presente memoria anticuerpos que se pueden utilizar en kits diagnósticos para la detección de la NL. También se describen en la presente memoria anticuerpos monoclonales que se fijan específicamente a la NL.

Un anticuerpo contra la NL puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal, con tal de que reconozca la proteína. Los anticuerpos se pueden sintetizar contra un antígeno que es la NL o su análogo con un proceso convencional de preparación de antisuero o anticuerpo. La presente invención describe el uso de anticuerpos monoclonales y policlonales. Se puede utilizar cualquier método adecuado para generar los anticuerpos utilizados en los métodos y las composiciones descritos en la presente memoria. Por ejemplo, para la preparación de un anticuerpo monoclonal, una proteína, como tal, o junto con un vehículo o diluyente, se administra a un animal (p. ej., un mamífero) en condiciones que permiten la producción de anticuerpos. Para potenciar la capacidad de producción de anticuerpos, se puede administrar el adyuvante completo o incompleto de Freund. Normalmente, la proteína se administra una vez cada 2 a 6 semanas, en total, de unas 2 veces a unas 10 veces. Los animales adecuados para uso en tales métodos incluyen, pero sin limitarse a ellos, primates, conejos, perros, conejillos de Indias, ratones, ratas, ovejas, cabras, etc.

Para preparar células productoras de anticuerpos monoclonales, se selecciona un animal individual cuya titulación de anticuerpo se ha confirmado (p. ej., un ratón) y, de 2 días a 5 días después de la inmunización final, se le recoge el bazo o ganglio linfático y las células productoras de anticuerpo contenidas en éste se fusionan con células de mieloma para preparar el hibridoma productor del anticuerpo monoclonal. La medición de la titulación del anticuerpo en el antisuero se puede realizar, por ejemplo, haciendo reaccionar la proteína marcada, tal y como se describe más adelante, con el antisuero y luego medir la actividad de la molécula de marcación fijada al anticuerpo. La fusión celular se puede realizar según los métodos conocidos, por ejemplo, el método descrito por Kohler y Milstein (*Nature* 256: 495 [1975]). Como promotor de la fusión, por ejemplo, se utiliza el virus Sendai (HVJ) o, preferentemente, polietilenglicol (PEG).

Se pueden preparar anticuerpos policlonales mediante cualquier método conocido o modificaciones de estos métodos, que incluyen obtener anticuerpos de los pacientes. Por ejemplo, se prepara un complejo de un inmunógeno (un antígeno contra la proteína) y se prepara un vehículo proteico, y se inmuniza un animal mediante el complejo de la misma forma que se ha descrito con respecto a la preparación del anticuerpo monoclonal descrita más arriba. Del animal inmunizado se recupera un material que contiene el anticuerpo, y el anticuerpo se separa y purifica.

También se describe un método para inhibir la proliferación y/o migración de las células endoteliales mediante la producción de un anticuerpo de fusión que contiene un anticuerpo anti-NL conjugado a un agente citotóxico tal como una quimiocina, a saber, un factor α de la necrosis tumoral, etc. Cuando se administra tal anticuerpo de fusión a una muestra de células, que incluyen las células endoteliales, el anticuerpo anti-NL dirigirá el agente tóxico hacia las células endoteliales y, por lo tanto, hará que el agente tóxico, tal como el factor de la necrosis tumoral, actúe sobre las células endoteliales y destruya el crecimiento celular.

Se conocen bien en la técnica métodos para conjugar un anticuerpo a un segundo agente tal como un agente citotóxico para formar un anticuerpo de fusión, también conocido como un inmunotóxico. Dos de los avances importantes en el campo de las inmunotoxinas han sido el uso de la tecnología del ADN recombinante para producir toxinas recombinantes con mejores propiedades clínicas y la producción de inmunotoxinas monocatenarias al fusionar los elementos de ADN que codifican regiones de fusión de anticuerpos, factores de crecimiento, o citocinas, a un gen de toxina.

Se construyeron inmunotoxinas de primera generación al conjugar toxinas a Acm o fragmentos de anticuerpos mediante un agente de entrecruzamiento heterobifuncional. También se descubrió que se podría utilizar la ingeniería genética para reemplazar los dominios de unión celular de las toxinas bacterianas con las porciones Fv de anticuerpos o con factores de crecimiento.

Tal y como se conoce bien en la técnica, las citocinas son moléculas proteicas pequeñas que son el núcleo de comunicación entre las células del sistema inmunitario, e incluso entre estas células y las células que pertenecen a otros tipos de tejidos. Las secretan activamente las células inmunitarias así como otros tipos de células. Las citocinas que producen las células inmunitarias forman un subconjunto conocido como linfocinas. Su acción a menudo es local, pero algunas veces pueden tener efectos sobre todo el cuerpo.

Hay muchas citocinas conocidas que tienen tanto acción estimuladora como supresora sobre los linfocitos y la respuesta inmunitaria. Algunas de las citocinas mejor conocidas incluyen: histamina, prostaglandina, TNF- α , IL-1 e IL-6. Hay tres clases de citocinas. Un aspecto de la invención es el uso de los anticuerpos anti-NL para detectar selectivamente una gran cantidad de células tumorales o células endoteliales que expresan la NL sobre su superficie. Resulta beneficioso encontrar tal grupo de pacientes al que aplicar con eficacia el tratamiento contra las neoplasias malignas relacionadas con la angiogénesis, ya que los pacientes que expresan una gran cantidad de NL

sobre la superficie son candidatos ideales para el tratamiento antitumoral con ES.

Para mejorar la sensibilidad de las células tumorales a la ES, la presente invención da a conocer el método siguiente: introducir el gen de NL exógeno en las células diana, que a su vez son capaces de expresar la NL en la superficie celular por encima del nivel normal. Estas células diana modificadas se harán más sensibles a la prueba de provocación de la ES debido a la gran cantidad de NL.

También se describen en la presente memoria kits para la detección y caracterización de la nucleolina en el diagnóstico del cáncer. Los kits contienen anticuerpos específicos contra la NL, además de reactivos de detección y tampones. En otras realizaciones, los kits contienen reactivos específicos para la detección del ARNm o del ADNc (p. ej., sondas oligonucleotídicas o cebadores) de la NL. Los kits contienen todos los componentes necesarios para realizar un ensayo de detección, que incluyen todos los controles, indicaciones para realizar los ensayos y los programas informáticos necesarios para el análisis y presentación de los resultados.

En la presente memoria también se describen los kits que contienen moléculas marcadoras tales como anticuerpos contra la NL para medir la NL. Se prepara una solución de anticuerpo de tal forma que puede detectar la presencia de péptidos de NL en los extractos de plasma, orina, tejidos, y se examinan además en medios de cultivo celular para establecer fácilmente el uso de kits para la medición y localización rápida, fiable, sensible y específica de la endoestatina. Estos kits de ensayo incluyen, pero sin limitarse a ellas, las técnicas siguientes: ensayos competitivos y no competitivos, radioinmunoensayo, ensayos de bioluminiscencia y quimioluminiscencia, ensayos fluorimétricos, ensayos de tipo sándwich, ensayos inmunoradiométricos, transferencias puntiformes, ensayos con enzimas conjugadas incluido el ELISA, placas de microtitulación, tiras recubiertas de anticuerpo o tiras reactivas para controlar rápidamente la orina o la sangre, e inmunocitoquímica. Para cada kit, el intervalo, sensibilidad, precisión, fiabilidad, especificidad y reproducibilidad del ensayo se establecen según las prácticas de la industria que el experto en la técnica conoce bien y utiliza.

De igual forma, se puede utilizar un kit diagnóstico para la localización de la endoestatina en tejidos y células. Este kit de inmunohistoquímica de la NL proporciona instrucciones, moléculas de NL, preferentemente marcadas y conjugadas a una molécula fluorescente tal como el isotiocianato de fluoresceína, o a algún otro reactivo utilizado para visualizar el antisuero primario. Los expertos en la técnica conocen bien las técnicas inmunohistoquímicas. Este kit de inmunohistoquímica de NL permite la localización de la endoestatina en los cortes de tejidos y en las células cultivadas mediante la microscopía óptica y electrónica. Se utiliza para propósitos de investigación y clínicos. Por ejemplo, se recogen tumores o se les realiza una biopsia y se cortan secciones del tejido con un micrótopo para examinar sitios de producción de endoestatina. Esta información es útil para propósitos diagnósticos y posiblemente terapéuticos a la hora de detectar y tratar el cáncer.

Esta invención se ilustra además con los ejemplos siguientes, que no se ha de interpretar de ninguna manera que planteen limitaciones al alcance de los mismos.

Ejemplos

Ejemplo 1

La nucleolina es una proteína de fijación a la endoestatina

Para investigar el mecanismo de acción de la ES, aislamos proteínas de fijación a la ES directamente de las proteínas de la membrana de células endoteliales microvasculares humanas (CEMH) con ES inmovilizada. Se identificó la nucleolina como un miembro crítico en la red de señalización de la ES, y es la más interesante de la red. Aquí describimos que la NL funciona como un receptor nuevo para la ES, y que interviene en la actividad de la ES en la angiogénesis.

Metodología:

Los métodos que se utilizan en el estudio de la NL y las interacciones de la ES se conocen de forma general en la técnica. Las descripciones de estos métodos se dan a conocer a continuación. Y se utilizan los materiales siguientes: células endoteliales (CEMH o CEVUH) (ATCC 10636 y CRL-1730), ES (Protgen), NL (expresada por *Pichia* (Invitrogen)), anticuerpos monoclonales anti-NL (comprados a Santa Cruz).

Ensayo de migración celular

Se inocularon células endoteliales (CEMH o CEVUH, 2×10^4 por pocillo) en la cámara superior del filtro Transwell™ (poros de 8 μ m, Costar) con medio DMEM que contiene STF al 0,5% (Hyclone) y FCEV a 10 ng/ml (PeproTech EC). Al comienzo del ensayo de migración, en la cámara superior y en la inferior se añadieron ES (de Protgen) a las concentraciones indicadas y otros reactivos (NL y anti-NL). Se dejó que las células endoteliales migraran durante 6 h a 37 °C y con CO₂ al 5%. Después de fijarlas con etanol y de tñirlas con eosina, las células que migraron completamente por el filtro hasta la cámara inferior se calcularon como el número medio de células observadas en cinco campos de gran aumento al azar (x400) por pocillo en pocillos por triplicado.

Ensayo de proliferación celular

- Se inocularon células endoteliales (CEMH o CEVUH, 1×10^3 por pocillo) en una placa de 96 pocillos con medio DMEM que contiene STF al 0,5% y bFGF a 10 ng/ml (PeproTech EC). Al comienzo del ensayo de proliferación se añadieron ES a las concentraciones indicadas y otros reactivos con un volumen final de 200 μ l por pocillo. Se dejaron proliferar las células endoteliales durante 48 h a 37 °C y CO₂ al 5%. Después de una incubación de 48 horas, se reemplazó el medio con medio DMEM sin rojo fenol y con MTT a 0,5 mg/ml (Sigma) con un volumen final de 100 μ l. Se incubaron las células otras 4 horas más a 37 °C y en CO₂ al 5%. Posteriormente, las células se lisaron con isopropanol que contiene cloruro de hidrógeno a 0,05 M y se midió la absorbancia a 570 nm.

Identificación de proteínas aisladas con espectrometría de masas MALDI-TOF

- Las fracciones obtenidas de la columna de afinidad ES-Ni-NTA (Qiagen) se aplicaron en SDS-PAGE al 12%, y las bandas principales se digirieron con tripsina porcina modificada de calidad para secuenciación (Promega). Se analizaron los péptidos producidos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF con un espectrómetro de tiempo de vuelo lineal Biflex de Bruker (Bruker Franzen), equipado con una fuente de multisondas SCOUT, un láser ultravioleta (337 nm) y un detector de placa microcanal dual. Los datos del MALDI-TOF se buscaron en la base de datos de proteínas Swiss-Prot para identificar las proteínas.

Inmunofluorescencia indirecta

- Se incubaron las CEMH con ES (20 μ g/ml) durante 1 hora a 37 °C y en CO₂ al 5%. Sin permeabilizarlas, se tiñeron las CEMH con los anticuerpos indicados. Se utilizaron como anticuerpos secundarios IgG antirratón de cabra conjugado a FITC e IgG anticonejo de cabra conjugado a TRITC (Santa Cruz). Se tomaron imágenes de fluorescencia confocal en un sistema de imágenes confocales de barrido láser Olympus Fluoview (Olympus Inc.). Se capturaron las imágenes con varios tubos fotomultiplicadores regulados mediante el programa informático Fluoview 2.0 (Olympus).

Producción de nucleolina recombinante

- El ADNc de la NL se obtuvo de las CEMH mediante el sistema de aislamiento del ARN y retrotranscripción (Promega). La secuencia de NL que se iba a fusionar con una etiqueta de polihistidinas (His)₆ se subclonó en el pPIC9K (Invitrogen). Este plásmido se linealizó con la enzima de restricción Sall (Promega) y se transformó por electroporación en la cepa GS 115 de *Pichia* (Invitrogen). Se seleccionó un transformante estable con G418 (Invitrogen) y luego se hizo crecer en un matraz en agitación a 30 °C durante 3 días en medio BMMY tal y como describe el fabricante. Se obtuvo el sobrenadante y la NL se purificó con columnas de afinidad de iones de níquel Ni-NTA (Qiagen).

Preparación de anticuerpos policlonales contra la nucleolina

- Se inmunizaron conejos blancos de Nueva Zelanda con 50 μ g de NL recombinante preparada mediante el sistema de expresión de *Pichia* pPIC9K-GS115 tal y como se ha descrito anteriormente. Se administró la inyección subcutánea inicial en adyuvante completo de Freund (Sangon), y se administró por vía intramuscular el día 14 una dosis de refuerzo de 50 μ g en el adyuvante incompleto de Freund. Se administraron por vía subcutánea refuerzos de 50 μ g de NL sin ningún adyuvante a las 4, 10, 16 y 22 semanas. Una semana después del último refuerzo se obtuvo el suero, y se purificó la IgG mediante cromatografía de afinidad en una columna con proteína A (Amersham Biosciences), se eluyó con tampón de glicina-HCl (0,15 M, pH 2,5) e inmediatamente se neutralizó con Tris a 0,15 M a un pH de 6,8 a 7,2. Las fracciones combinadas se esterilizaron y se filtraron (0,2 μ M) (Millipore) y las alícuotas de la preparación de anticuerpos se conservaron a -80°C.

Ensayo de adhesión celular

- Las células a analizar se mantuvieron en ayuno de suero durante 30 min y luego se inocularon en una placa de 96 pocillos que está recubierta con endoestatina (20 μ g/ml) y polilisina (50 μ g/ml) (Sigma). Se incubó la placa durante 1 hora a 37 °C y en CO₂ al 5%. Se retiraron las células sin unir lavándolas suavemente con medio nuevo. Las células restantes se tiñeron con violeta de genciana (0,1% en ddH₂O) (Amresco) durante 25 min a TA. Lo sembrado en placa se lavó con agua corriente, y el violeta de genciana restante se solubilizó con Triton X-100 al 0,5% (Sangon) (diluido en ddH₂O). Se midió la absorbancia en 570 nm.

- Como las dianas de muchos inhibidores de la angiogénesis, las células endoteliales se utilizan como modelos para los ensayos de antiangiogénesis *in vitro*. Desgraciadamente, los resultados son normalmente variables e inconstantes, probablemente debido al hecho de que los ensayos no se plantean bien y de que las estirpes celulares no son tan estables. Para este fin, se eligió la estirpe celular de las CEMH al satisfacer los criterios de un buen modelo para el ensayo antiangiogénico. En el ensayo de migración celular, la ES inhibió la migración de las CEMH estimuladas por el FCEV de un modo dependiente de la dosis, y se observó que la concentración inhibidora semimáxima (CI₅₀) estaba en 4 μ g/ml (figura 1a). La ES inhibió la migración de las CEMH en un 15% incluso a una concentración de tan solo 4 ng/ml (datos no mostrados). Se obtuvieron resultados similares en el ensayo de proliferación de las CEMH con bFGF como estímulo (figura 1b). Los resultados del ensayo de migración celular y del

ensayo de proliferación demostraron que las CEMH son muy sensibles a la ES de tal modo que se pueden obtener resultados fiables y repetibles.

La respuesta de sensibilidad de las CEMH a la ES implica que las CEMH pueden contener posible(es) receptor(es) para la ES. Además, la ES se puede unir específicamente a las CEMH en condiciones fisiológicas (véase la figura 2d abajo). Por lo tanto, empezamos aislando receptor(es) de la ES en las CEMH. Se precargó la ES recombinante en las perlas de Ni-NTA a través de la etiqueta de His del extremo amino. Se preparó una fracción bruta de la membrana plasmática de las CEMH y se trató con Triton X-100 al 1% para liberar proteínas de la membrana plasmática como se describe en Marshak et al. Las proteínas preparadas de la membrana plasmática se aplicaron a las perlas de ES-Ni-NTA. De las perlas de ES-Ni-NTA se retiraron las proteínas sin unir con tampón PBS. Se recogió cada fracción y se sometió a análisis en SDS-PAGE en condiciones reductoras. El control se llevó a cabo en paralelo, y la única diferencia fue sustituir ES-Ni-NTA por Ni-NTA. Dos proteínas con masas moleculares aparentes de 110 kDa y 80 kDa mostraron una capacidad de unión específica a las perlas de ES-Ni-NTA (figura 2a) y posteriormente se identificaron como NL (110 kDa) y su fragmento degradado (80 kDa) mediante la huella dactilar de la masa de los péptidos utilizando espectrometría de desorción e ionización por láser asistida por una matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF). La identidad de la NL se analizó adicionalmente mediante inmunotransferencia (IT) con el anticuerpo monoclonal (Santa Cruz) contra NL (figura 2a). Para verificar la interacción entre la ES y la NL, se realizaron los estudios siguientes. Los resultados de la inmunoprecipitación (IP) *in vitro* demuestran que la interacción entre la ES y la NL recombinante es específica (figura 2b) y que se forma un complejo entre la ES y la NL. Este complejo se puede romper con heparina a 200 mM (figura 2c). La ES también se puede fijar a las CEMH a través de la NL porque los anticuerpos policlonales contra la NL (preparado según Ausubel et al., 1995) pueden bloquear tal fijación (figura 2d). Esta conclusión se verificó además mediante IP, que se llevó a cabo con las CEMH preincubadas con ES (figura 2e). Los resultados muestran que la ES y toda la NL endógena (superficie celular, citoplasma y núcleo) forman un complejo en las células vivas. Además, también se observó una colocalización entre la ES y la NL sobre la superficie celular de las CEMH mediante microscopia de inmunofluorescencia confocal de barrido láser (figura 2f-i). Considerado en conjunto, la ES se une específicamente a la NL tanto *in vitro* como *in vivo*, lo que indica que la NL es un posible receptor de la ES.

Ejemplo 2

La nucleolina es un nuevo receptor para la endoestatina

Si la NL es un receptor para la ES, debe mediar las actividades de la ES en la angiogénesis de modo que inhiba la migración, proliferación y adhesión de las células endoteliales. Para caracterizar la función de la NL durante el proceso de mediación de las actividades de la ES, se realizaron, por lo tanto, ensayos de migración y proliferación celular competitivos con la ES, la NL recombinante y anticuerpos policlonales contra la NL, respectivamente. Dado que la NL se aisló de las CEMH como un posible receptor de la ES en la angiogénesis, hay que demostrar si la NL desempeña o no funciones similares en otras células endoteliales ampliamente aceptadas. Con este fin, las células endoteliales de la vena umbilical humana (CEVUH), aisladas directamente de venas umbilicales, se sometieron a ensayos competitivos de migración y proliferación celulares. Esta clase de células endoteliales puede migrar a través de una membrana de microporos (8 µm) con la estimulación del FCEV, y la ES inhibe tal migración. La NL recombinante elevó la inhibición de la ES en el ensayo de migración celular de una manera dependiente de la dosis (figura 3a), lo que indica que la NL recombinante interviene en las actividades angiogénicas de la ES. La posibilidad de que la propia NL tenga una actividad estimulante de la migración de las células endoteliales se descartó porque la propia NL recombinante no tuvo ningún efecto sobre la migración celular como se muestra en la figura 3b. También se obtuvieron resultados similares cuando se realizó el ensayo de proliferación celular con las CEVUH (figura 3c). No es nada sorprendente que los anticuerpos policlonales contra la NL bloqueasen la inhibición de la ES sobre la proliferación celular (figura 3c). Además, como se muestra en la figura 3f, cuando se realizó el ensayo de proliferación celular con células deficientes en NL y las CEMH de control, se puede observar que el efecto angiogénico de la ES requirió la presencia de la molécula de NL en las células diana. Todos estos estudios sugieren rotundamente que la NL es un receptor de la ES en la angiogénesis.

Para confirmar adicionalmente que la NL es el receptor de la ES, se suprimió la expresión de la NL mediante interferencia por ARN (iARN). (Sui, G et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 2002, p. 5515-5520), y luego se evaluó tal cambio en la adhesión celular, otra actividad importante de la ES en la angiogénesis. Los resultados muestran que la adhesión de las CEMH sobre la ES inmovilizada y la polilisina inmovilizada (Sigma), una matriz extracelular sintética, disminuyen significativamente cuando se suprime la expresión de NL mediante iARN basada en vectores de ADN (figura 3d), incluso aunque la expresión de NL no se suprimiera completamente (figura 3e). Rehn et al describieron que la adhesión de las células endoteliales sobre la ES inmovilizada es decisiva para actividades de la ES, tales como la formación de adhesiones focales y la fosforilación de FAK, y la pérdida de esta adhesión implica la pérdida de funciones de la ES sobre las células endoteliales. En consonancia con la evolución de estos estudios, nuestros resultados demostraron que la NL es esencial para las actividades de la ES y la adhesión de las células endoteliales a la matriz extracelular (MEC). Además, cuando se inhibió la expresión de la NL mediante iARN basada en vectores de ADN, también se comprobó el efecto de las CEMH sobre otro aspecto importante de la angiogénesis, la proliferación celular. Cuando se inhibió la expresión de NL en la membrana celular de la CEMH, la proliferación de las CEMH no se vio inhibida por la ES. Sin embargo, la proliferación de las células en las que no está inhibida la expresión de la NL se inhibió por la ES (figura 3f). En resumen, concluimos que la NL es un nuevo receptor de la ES

y que desempeña una función clave en las vías de transducción de señales de la ES.

Ejemplo 3

La nucleolina interviene en la vía de señalización de la endostatina

Para desentrañar la función exacta de la NL en las vías de transducción de señales de la ES, investigamos entonces los acontecimientos vía abajo. Recordamos que la cantidad de complejo ES-NL varió al incubar la ES con las CEMH, y alcanzó el valor máximo en torno a 2 horas (figura 2e). La ES se puede interiorizar en las CEMH a través de la NL de la superficie celular, y parte de la ES interiorizada se degrada posteriormente en las CEMH. Parece que hay un equilibrio entre la interiorización de la ES y su degradación (figura 2e).

Para confirmar que la interiorización de la ES se debe a la NL de la superficie celular, se llevó a cabo la localización inmunofluorescente con ES biotinilada (Pierce). Se incubaron las CEMH con la ES biotinilada durante diferentes tiempos, y se observó el proceso de interiorización de la ES al microscopio de fluorescencia (Olympus) después de que la ES biotinilada se tiñera con estreptavidina marcada con TRITC (figuras 4a-f). Después de 30 min de incubación, la mayoría de la ES interiorizada se distribuyó en el citoplasma, pero la cantidad era pequeña (figura 4b). Después de 1 hora de incubación, la ES interiorizada aumentó y comenzó a acumularse en el núcleo (figura 4c). La cantidad de ES interiorizada alcanzó el máximo a unas 2 horas de incubación (figura 4d). Al cabo de 3 horas, la ES acumulada en el núcleo comenzó a desaparecer (figura 4e). Pasadas 7 horas, se podía encontrar poca ES en el núcleo (figura 4f). Había un desfase en el ensayo de fluorescencia (figuras 4b-d) en comparación con la IP (figura 2e) para que la cantidad de ES interiorizada alcanzara su máximo, probablemente la velocidad de degradación de la ES es más rápida que la de la ES biotinilada. Es importante señalar que la cantidad de ES biotinilada interiorizada se redujo significativamente cuando se preincubaron las CEMH con anticuerpos policlonales contra la NL, lo que demuestra que la ES se interioriza a través de la NL de la superficie celular (figuras 4d, g). Es más, se observaron al microscopio de fluorescencia algunos puntos claros pequeños dentro de las células (figuras 4b-e), lo que puede sugerir que la ES se interioriza en vesículas en el proceso de interiorización. Esta observación es coherente con los informes previos de Wickstrom y Christian et al.

Para explicar cómo interviene la NL en la interiorización de la ES, se llevaron a cabo experimentos de entrecruzamiento e IP, respectivamente, durante el proceso de interiorización de la ES. Primero, esperábamos aislar el complejo de ES, NL y otras proteínas en las CEMH vivas con reactivos de entrecruzamiento. Así, utilizando BS3 (un reactivo de entrecruzamiento de PIERCE Ltd.), obtuvimos un enorme complejo con una masa molecular de mucho más de 300 kDa (datos no mostrados). Aunque este complejo se puede teñir con anticuerpos contra la ES o contra la NL, no se pudo identificar ninguno de los componentes con este método. Alternativamente, la IP con anticuerpos policlonales contra la NL se introdujo en las CEMH lisadas para aislar las proteínas que interaccionan directamente con la NL. Así se encontró una proteína con una masa molecular de unos 200 kDa, y se identificó como miosina no muscular mediante PMF utilizando MALDI-TOF. Las miosinas constituyen una enorme superfamilia, que interviene en la dinámica de la membrana y la organización de la actina en la corteza celular, afectando de esta manera a la migración, adhesión y endocitosis celulares. Dentro de esta superfamilia, las miosinas de clase V de dos cabezas pueden servir como transportadores de vesículas, orgánulos y partículas de ARNm a lo largo de los filamentos de actina. También encontramos que la NL de la superficie celular puede fijarse a la ES y transportar la ES al núcleo celular (figuras 4a-f). Como la miosina es una proteína intracelular, se debe fijar al dominio intracelular de la NL de la superficie celular. Proponemos que este complejo de NL y miosina puede servir como transportador durante el proceso de interiorización de la ES. Procedimientos similares también fueron descritos por Shibata et al, donde *midkine*, un factor de crecimiento en las células nerviosas, también se puede interiorizar y localizar en el núcleo mediante la NL. Es interesante señalar que los anticuerpos contra el extremo amino de la NL se pueden interiorizar en las células Hep-2 a través de la NL de la superficie celular. Por consiguiente, la interiorización aparece como un fenómeno general y es inevitable cuando un ligando se fija a la NL de la superficie celular. La diferencia es que la ES puede inhibir la proliferación celular mientras los anticuerpos contra la NL no pueden (figura 3c).

Estas observaciones indican que, aunque muchos ligandos se pueden fijar a la NL de la superficie celular específicamente y favorecer su interiorización, sus destinos tras la interiorización son diferentes. A continuación se investigaron las funciones de la ES cuando se transportó al núcleo. Bouche et al. describieron que la NL puede promover la transcripción del ADN y la biogénesis del ribosoma en el núcleo, que son decisivos para la supervivencia y la proliferación celulares, siempre y cuando los restos serina del extremo amino los fosforilen algunas clases de cinasas, tales como la caseína cinasa 2 (CK2) por la estimulación del bFGF. Folkman y colaboradores también describieron que la proliferación de las células endoteliales, que está estimulada por el bFGF, podría verse inhibida por la ES. Según los estudios de Bouche et al., la fosforilación de la NL estimulada por bFGF se debe a la CK2, pero no a otras cinasas, tales como cdc2, en este sistema de núcleos aislados. Por consiguiente, proponemos que la ES inhibe la proliferación celular al inhibir la fosforilación de la NL debida a la CK2, que está estimulada por el bFGF. Para confirmar esta hipótesis, se aislaron los núcleos de las CEMH quiescentes y se llevó a cabo el ensayo de fosforilación con o sin ES. Los resultados demuestran que la fosforilación de la NL se inhibió cuando se preincubaron los núcleos de las CEMH con la ES (figura 4h). Además, la fosforilación de la NL está estimulada por el bFGF en vez del FCEV (figura 4h), lo que puede proporcionar una explicación para los hallazgos anteriores de que el bFGF puede estimular la proliferación de las células endoteliales, mientras que el

FCEV puede estimular la migración de las células endoteliales. Nuestras observaciones demuestran que la ES inhibe la fosforilación de la NL estimulada por el bFGF en la que interviene CK2 y, por consiguiente, inhibe la supervivencia y proliferación celulares.

Ejemplo 4

5 La ES altera la movilidad y la adhesión celulares a través del complejo NL-miosina

Hasta ahora hemos demostrado que la NL es un nuevo receptor de la ES que inhibe la migración, proliferación y adhesión celulares. Dado que también se describió que la integrina es un receptor de la ES, es interesante comprobar si hay una interacción entre la NL y la integrina. Entre la familia de las integrinas, Rehn et al. y Sudhakar et al. describieron que la integrina $\alpha 5 \beta 1$ era el receptor de la ES; por lo tanto, se realizó la colocalización entre la NL de la superficie celular y la integrina $\alpha 5 \beta 1$ mediante inmunofluorescencia indirecta con la antiintegrina $\beta 1$ de rat (Santa Cruz) y la anti-NL de conejo. Se observó cierto solapamiento entre la NL de la superficie celular y la integrina $\beta 1$ mediante microscopia confocal de barrido láser (figura 4i-k), lo que sugiere que hay cierta interacción entre la NL y la integrina $\beta 1$ en la superficie celular. Por consiguiente, la IP con anticuerpos policlonales contra la NL se introdujo para capturar el complejo entre la NL y la integrina $\beta 1$. Desgraciadamente, la integrina $\beta 1$ no se puede detectar en el precipitado, lo que implica que la interacción entre la NL y la integrina $\beta 1$ es indirecta. Estudios previos demostraron que la miosina está implicada en la dinámica de la membrana y la organización de la actina en la corteza celular, afectando así a la migración, adhesión y endocitosis celulares. También demostramos que la NL y la miosina no muscular forman un complejo en la corteza celular, y que este complejo es decisivo para la movilidad y la adhesión de las células endoteliales. Por lo tanto, proponemos que la ES puede interferir con la movilidad y la adhesión celulares mediadas por el complejo formado por la NL y la miosina. Es plausible que la NL de la superficie celular y la integrina $\alpha 5 \beta 1$ junto con otras proteínas, tales como la miosina, formen un gran complejo que en conjunto sirve como un receptor integrado de la ES (véase la figura 6).

Ejemplo 5

La distribución de la NL proporciona una base para la poca toxicidad de la endoestatina

La endoestatina inhibe específicamente la angiogénesis y el crecimiento tumoral, no se observó ninguna toxicidad en las pruebas con animales y sí algo de toxicidad en los ensayos clínicos de la ES. El mecanismo molecular exacto detrás de estas observaciones todavía se desconoce. Nuestra conclusión de que la NL interviene en las actividades específicas de la ES en la antiangiogénesis parece contradecir el informe previo de que la NL es una proteína ubicua en las células. Para aclarar esta paradoja, se investigó la abundancia de la NL de la superficie celular en las CEMH en diferentes etapas de crecimiento. No es sorprendente que los resultados muestren que la abundancia de la NL de la superficie celular es mucho mayor en las células en proliferación que en las células relativamente quiescentes (figura 5a-f). Las células relativamente quiescentes se obtuvieron mediante ayuno de suero durante 24 horas, y se detectó la etapa del ciclo celular mediante citometría de flujo (Becton Dickinson, Worldwide Inc., San José, CA) (figura 5g-h). Los resultados de la citometría de flujo muestran que la proporción de la fase G1 aumenta en torno a un 24%, y la fase S disminuye un 30% después del ayuno de suero (figura 5g-h). Aunque las células no se detienen completamente en G1, la cantidad de NL de la superficie celular disminuyó significativamente después del ayuno de suero durante 24 horas. Proponemos que esta abundancia diferente de NL en la superficie celular puede dar lugar a una sensibilidad diferente de las células endoteliales en respuesta a la ES.

Para investigar si se pueden encontrar fenómenos celulares similares en los estudios con animales, se midieron la abundancia de la NL de la superficie celular en los tejidos tumorales y en los órganos normales. Se inyectaron anticuerpos policlonales contra la NL en el dorsal subcutáneo de ratones atímicos portadores de tumor (obtenidos de Beijing Weitonglihua Experimental Animal Technology Co. Limited) en un sitio alejado de donde se inoculó el tumor, y se realizó la inmunohistoquímica para determinar dónde se localizan estos anticuerpos (figura 5i-l). Los resultados demuestran que los anticuerpos contra la NL se acumulan sólo en las células endoteliales inducidas por el tumor, pero no en los tejidos normales, tales como el corazón, riñón y pulmón (figura 5i-l). Estos descubrimientos son perfectamente coherentes con la teoría de Folkman sobre la antiangiogénesis: en los adultos, las células endoteliales de los vasos sanguíneos se encuentran en un estado quiescente con poco recambio, salvo que se induzcan por algunos estímulos angiogénicos endógenos, y las células endoteliales en proliferación aparecen en algunos procesos angiogénicos fisiológicos o patológicos, tales como el crecimiento tumoral y la metástasis. En resumen, la diferente abundancia de la NL de la superficie celular, el receptor de la ES, en las células endoteliales ofrece una explicación de la poca toxicidad de la ES en las pruebas con animales y en los ensayos clínicos: ya que la NL de la superficie de las células endoteliales en los vasos sanguíneos inducidos por el tumor es mucho más abundante que en los órganos normales, la ES por lo tanto se fija específicamente a la NL y ejerce su función antiangiogénica selectivamente sobre los tejidos tumorales; por otra parte, la ES rara vez se fija a los órganos normales porque no tiene mucha NL sobre su superficie celular, lo que a su vez no induce toxicidad durante el tratamiento con ES.

Ejemplo 6**La nucleolina recombinante modula el funcionamiento de la endoestatina en el ensayo de migración celular**

Se obtuvo el ADNc de la NL a partir de células endoteliales microvasculares humanas (CEMH) mediante el sistema de aislamiento del ARN total de SV y el sistema de transcripción inversa (Promega) siguiendo el protocolo del fabricante. La secuencia de NL que se fusiona con la etiqueta de polihistidinas (His)₆ se amplificó por PCR y luego se subclonó en el pPIC9K (Invitrogen). Siguiendo el protocolo del fabricante, este plásmido se linealizó con la enzima de restricción Sall (Promega) y se transformó por electroporación dentro de la cepa de levadura GS115. Se seleccionó un transformante estable con G418 y luego se hizo crecer en un matraz con agitación a 30 °C durante 3 días en medio BMMY (extracto de levadura a 10 g/l; peptona a 20 g/l; fosfato de potasio a 100 mmol/l, pH 6,0; bases nitrogenadas de levadura a 13,4 g/l; biotina a 40 mg/l; y adiciones diarias de metanol al medio para producir una concentración final del 0,5%). Se obtuvo el sobrenadante y se purificó la NL en columnas de afinidad de iones de níquel Ni-NTA (Qiagen). Ajustamos 1 l de sobrenadante a pH 8,0 y se aplicó a una columna con 6 ml de perlas de Ni-NTA. La columna se lavó y se eluyó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se obtuvieron unos 3 mg de NL por litro mediante este procedimiento. Con esta proteína se prepararon anticuerpos policlonales contra la nucleolina.

Se inocularon células endoteliales de la vena umbilical humana (CEVUH) (2×10^4 por pocillo) en la cámara superior de un filtro Transwell (poros de 8 μ m, Costar) con medio DMEM, STF al 0,5% y bFGF a 10 ng/ml (PeproTech EC). Se añadieron ES (5 μ g/ml, Protgen) y nucleolina -rh (20 μ g/ml) o anticuerpos contra la nucleolina (20 μ g/ml) al comienzo del ensayo de migración. A modo de control, se añadió PBS en este sistema del ensayo de migración. En la cámara inferior se añadieron los mismos medio DMEM y reactivos. Se dejaron migrar las células endoteliales durante 6 h a 37 °C y CO₂ al 5%. Después de fijarlas y tñirlas con etanol y eosina, las células que migraron completamente a través del filtro hacia la cámara inferior, se contaron en cinco áreas diferentes con el microscopio óptico, y se obtuvo el número medio. Los resultados demuestran que la nucleolina humana recombinante alivió la inhibición de la ES en el ensayo de migración celular de una manera dependiente de la dosis, lo que indica que la NL recombinante interviene en las actividades antiangiogénicas de la ES. De igual forma, los anticuerpos policlonales contra la NL bloquearon la inhibición de la ES sobre la proliferación celular.

Ejemplo 7**Aceleración del crecimiento tumoral cuando la nucleolina de la superficie celular se bloqueó con anticuerpos contra la nucleolina.**

Se obtuvo el ADNc de la NL a partir de células endoteliales microvasculares humanas (CEMH) utilizando el sistema de aislamiento del ARN total de SV y el sistema de transcripción inversa (Promega) siguiendo el protocolo del fabricante. La secuencia de NL que se fusionará con la etiqueta de polihistidinas (His)₆ se amplificó por PCR y luego se subclonó en el pPIC9K (Invitrogen). Siguiendo el protocolo del fabricante, este plásmido se linealizó con la enzima de restricción Sall (Promega) y se transformó por electroporación en la cepa de levadura GS115. Se seleccionó un transformante estable con G418 (Invitrogen) y luego se hizo crecer en un matraz con agitación a 30 °C durante 3 días en medio BMMY (extracto de levadura a 10 g/l; peptona a 20 g/l; fosfato de potasio a 100 mmol/l, pH 6,0; bases nitrogenadas de levadura a 13,4 g/l; biotina a 40 mg/l; y adiciones diarias de metanol al medio para producir una concentración final del 0,5%). Se obtuvo el sobrenadante y se purificó la NL en columnas de afinidad con iones de níquel de Ni-NTA (Qiagen). Ajustamos 1 l del sobrenadante a pH 8,0 y lo aplicamos a una columna con 6 ml de perlas de Ni-NTA. Se lavó la columna y se eluyó según las instrucciones del fabricante. Se obtuvieron unos 3 mg de NL por litro mediante este procedimiento. Con esta proteína se prepararon anticuerpos policlonales contra la nucleolina.

Se inocularon células Hela en el espacio subcutáneo de ratones atímicos (obtenidos de Beijing Weitonglihua Experimental Animal Technology Co. Limited). Comenzando al día siguiente, se inyectaron lentamente cada 3 días anticuerpos contra la NL en el dorsal subcutáneo de los ratones en un sitio alejado de donde se inocularon los tumores. Después de la séptima inyección, se mataron los ratones atímicos, se pesaron los tumores y se hicieron tres mediciones del tumor. Los resultados de estas pruebas con animales demuestran que el crecimiento tumoral se aceleró significativamente cuando se bloqueó la nucleolina de la superficie celular con anticuerpos contra la nucleolina. Estos resultados también demostraron que la nucleolina desempeña una función clave en la regulación del crecimiento tumoral y de la angiogénesis.

Ejemplo 8**Detección de inhibidores de la angiogénesis específicos de NL mediante cromatografía de afinidad con ES-Ni-NTA**

Se obtuvo el ADNc de NL de células endoteliales microvasculares humanas (CEMH) utilizando el sistema de aislamiento de ARN total de SV y el sistema de transcripción inversa (Promega) siguiendo el protocolo del fabricante. La secuencia de la NL que se fusionará con la etiqueta de polihistidinas (His)₆ se amplifica por PCR y luego se subclona en el pPIC9K (Invitrogen). Siguiendo el protocolo del fabricante, este plásmido se linealizó con la enzima de restricción Sall (Promega) y se transformó por electroporación dentro de la cepa de levadura GS115. Se

- seleccionó un transformante estable con G418 (Invitrogen) y luego se hizo crecer en un matraz con agitación a 30 °C durante 3 días en medio BMMY (extracto de levadura a 10 g/l; peptona a 20 g/l; fosfato de potasio a 100 mmol/l, pH 6,0; bases nitrogenadas de levadura a 13,4 g/l; biotina a 40 mg/l; y adiciones diarias de metanol al medio para producir una concentración final del 0,5%). Se obtuvo el sobrenadante y se purificó la NL en columnas de afinidad de iones de níquel de Ni-NTA (Qiagen). Ajustamos 1 l del sobrenadante a pH 8,0 y lo aplicamos a una columna con 6 ml de perlas de Ni-NTA. Se lava la columna y se eluye según las instrucciones del fabricante. Se obtienen unos 3 ml de NL por litro con este procedimiento. Se fija esta nucleolina sobre las columnas de afinidad de iones de níquel de Ni-NTA (Qiagen) a través de su péptido de fusión en el extremo amino. Esta perla de afinidad se puede utilizar para rastrear las proteínas de fijación a la nucleolina con un sistema de alto rendimiento. Se pueden identificar las proteínas de unión a la nucleolina mediante PFM con MALDI-TOF. La bioactividad de estas proteínas de fijación a la nucleolina en la antiangiogénesis se detecta con el experimento celular, tal como el ensayo de migración celular y el ensayo de proliferación celular, tal y como se describió más arriba.

Ejemplo nuevo

Colocalización de la ES y la NL sobre la superficie de los vasos sanguíneos del tumor

15 Método: resonancia de plasmón superficial (RPS)

- La cinética de unión se determinó mediante RPS con un sistema biosensor BIAcore 2000™ (Amersham Pharmacia Biotech). La ES purificada se diluyó a 100 µg/ml en acetato de sodio a 20 mM, pH 6,5, y se inmovilizó covalentemente en chips sensores CM5 de investigación con el kit de acoplamiento de amina (1-etil-3-(dimetilaminopropil)carbodiimida, (N-hidroxisuccinimida) según el fabricante. Se inyectó la ES (100 µg/ml) en acetato de sodio (pH 6,5) hasta que se obtuvo una diferencia de respuesta de 9000 unidades. Los restos sin reaccionar sobre la superficie se bloquearon con etanolamina (pH 8,5; BIAcore AB). El análisis de RPS entre ES y NL se realizó a 25 °C con un volumen de 20 µl de NL (62,5, 125, 250 y 500 nM) en tampón de flujo HBS (Hepes a 10 mM, NaCl a 150 mM, EDTA a 3,4 mM y tensioactivo P20 al 0,005%, pH 7,4; BIAcore AB) a una velocidad de flujo de 10 µl/min. La cinética temporal de la NL, sin tampón de flujo, se registró continuamente como unidades de resonancia (UR). Se regeneró la superficie mediante varios pulsos de 10 µl de NaOH a 100 mM (o HCl a 100 mM) que fluye a 10 µl/min. Se analizaron los datos originales con el programa informático BIAevaluation 3.1 (BIAcore AB), aplicando un modelo de fijación de Langmuir (estequiometría de 1:1) para calcular la k_a (constante de asociación, en $M^{-1}s^{-1}$), la k_b (constante de disociación, en $M^{-1}s^{-1}$) y la K_D (constante de equilibrio) para la interacción de ES con NL.

- La afinidad de la fijación entre ES y NL se determinó mediante resonancia de plasmón superficial (RPS) en tiempo real, que es un método rápido y sensible para evaluar las afinidades implicadas en la interacción bimolecular. La constante de equilibrio (K_D) para la interacción de ES con NL que se obtiene de estas curvas es de $2,32 \times 10^{-8}$ M.

Colocalización *in vivo*

- En el espacio subcutáneo de ratones Balb/c de 2 meses de edad se inocularon células de melanoma de ratón B16/F10 en crecimiento exponencial (2×10^6 células en 200 µl de PBS). Se utilizaron los animales para los experimentos de colocalización entre la ES y la NL *in vivo* 8 días después de la implantación. Se inyectaron por vía i.v. la ES biotinilada (40 µg) y anticuerpos policlonales de conejo contra NL (200 µg), respectivamente. La ES biotinilada (40 µg) y la IgG purificada de conejo se inyectaron por vía intravenosa a modo de control. Se anestesiaron los ratones 1 hora después de la inyección, se perfundieron en el corazón con PBS a 20 ml y se mataron. Se fijaron y seccionaron algunos tejidos y el tumor de los ratones. Los cortes se detectaron con avidina conjugada con TRITC (Pierce) y anticuerpos secundarios conjugados con FITC (Santa Cruz), y se observaron con un sistema de imagen confocal de barrido láser Olympus Fluoview (Olympus Inc.).

- La colocalización entre la ES y la superficie celular también se puede observar *in vivo*. La ES biotinilada y los anticuerpos contra la NL se inyectaron por vía intravenosa en los ratones portadores de tumores B16-F10. La ES biotinilada y la IgG purificada de conejo se inyectaron por vía i.v. como control. Se recogieron los tejidos 1 h después de la inyección y se realizó la inmunofluorescencia. La ES marcada con biotina y los anticuerpos contra la NL se acumularon selectivamente sobre la superficie de los vasos sanguíneos de los tumores (figuras 7j-l). No se pudo detectar ninguno de ellos en los vasos sanguíneos de otros tejidos, tales como el corazón (figuras 7a-c), hígado (figuras 7d-f) y riñón (figuras 7g-i). En tejido tumoral se observó una convergencia perfecta entre la ES biotinilada y los anticuerpos contra la NL. La IgG de control no se detectó en los tejidos tumorales (figuras 7m-o). Estos resultados sugieren que la ES y la NL están colocalizadas sobre la superficie de los vasos sanguíneos de tumores, pero no en los vasos sanguíneos de otros tejidos normales.

Ejemplo 10

La relación entre la cantidad de NL sobre las células endoteliales diana y la actividad antiangiogénica de la ES

- El modelo de proliferación de las células endoteliales *in vitro* en el ejemplo 1 se utilizó para investigar la actividad antiangiogénica de la ES. El efecto de la ES sobre las células endoteliales defectuosas en NL se investigó utilizando este modelo para determinar la relación de la cantidad de NL sobre las células endoteliales y la actividad

antiangiogénica de la ES.

La expresión de la NL se inhibió mediante iARN y se detectó el efecto de este cambio de expresión sobre la proliferación celular, que también es un aspecto importante de la antiangiogénesis. Se inhibió la expresión de la NL en las CEMH transfectadas con el plásmido BS/U6/1356 para iARN basada en vectores de ADN (figura 9a), mientras que no se inhibió la expresión de NL en las CEMH transfectadas con los plásmidos de control BS/U6, BS/U6/263 y BS/U6/1356C (figura 9a). El inventor además investigó el efecto de la ES sobre la proliferación de las CEMH cuando la expresión de la NL está inhibida por la iARN basada en vectores de ADN. Y el resultado demostró que, aunque la expresión de la NL en las CEMH estaba inhibida, la ES no inhibió la proliferación de las CEMH, pero sí inhibió la proliferación de las CEMH en las que la expresión de la NL no estaba inhibida (figura 9b). De este resultado también podemos ver que la cantidad de NL en las células endoteliales está relacionada directamente con la actividad antiangiogénica de la ES. Por lo tanto, en un aspecto, podemos aumentar la actividad antiangiogénica de la ES aumentando la cantidad de la NL sobre las células endoteliales; en otro aspecto, podemos detectar la cantidad de NL en la neovascularización tumoral para predecir la eficacia de la ES sobre el tumor o el paciente portador del mismo.

Se construyó el plásmido BS/U6 para iARN basada en vectores de ADN como se describe en los artículos del Dr. Shi y colaboradores («A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells». Sui, G et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 2002, págs. 5515-5520): la secuencia de iARN BS/U6/1356 específica de NL es de 1356 a 1377 en NL; asimismo, la secuencia de iARN BS/U6/263 específica de NL es de 263 a 283 en NL (esta secuencia interferente no es activa). Se utilizó como control una secuencia aleatoria BS/U6/1356C compuesta por las mismas bases que la secuencia específica. Buscamos en el NCBI para comprobar que la secuencia aleatoria no era obviamente homóloga a ninguna de las secuencias conocidas. Los plásmidos se introdujeron por transfección en las células utilizando Lipofectin™ (Invitrogen).

Referencias

1. O'Reilly, M. S. et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88, 277-285 (1997).
2. Boehm, T., Folkman, J., Browder, T. & O'Reilly, M. S. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 390, 404-407 (1997).
3. Herbst, R. S. et al. Phase I Study of Recombinant Human Endostatin in Patients With Advanced Solid Tumors. *J. Clin. Oncol.* 20, 3792-3803 (2002).
4. Eder, J. P. Jr. et al. Phase I Clinical Trial of Recombinant Human Endostatin Administered as a Short Intravenous Infusion Repeated Daily. *J. Clin. Oncol.* 20, 3772-3784 (2002).
5. Dhanabal, M. et al. Endostatin: Yeast Production, Mutants, and Antitumor Effect in Renal Cell Carcinoma. *Cancer Res.* 59, 189-197 (1999).
6. Yamaguchi, N. et al. Endostatin inhibits VEGF-induced endothelial cell migration and tumor growth independently of zinc binding. *EMBO J.* 18, 4414-4423 (1999).
7. Rehn, M. et al. Interaction of endostatin with integrins implicated in angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 1024-1029 (2001).
8. Dixelius, J. et al. Endostatin-induced tyrosine kinase signaling through the Shb adaptor protein regulates endothelial cell apoptosis. *Blood* 95, 3403-3411 (2000).
9. MacDonald, N. J. et al. Endostatin Binds Tropomyosin. A potential modulator of the antitumor activity of endostatin. *J. Biol. Chem.* 276, 25190-25196 (2001).
10. Karumanchi, S. A. et al. Cell surface glypicans are low-affinity endostatin receptors. *Mol. Cell.* 7, 811-822 (2001).
11. Yu, Y. et al. E-selectin is required for the antiangiogenic activity of endostatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 8005-8010 (2004).
12. Hanai, J.-i. et al. Endostatin Causes G1 Arrest of Endothelial Cells through Inhibition of Cyclin D1. *J. Biol. Chem.* 277, 16464-16469 (2002).
13. Orrick, L. R., Olson, M. O. J. & Busch, H. Comparison of Nucleolar Proteins of Normal Rat Liver and Novikoff Hepatoma Ascites Cells by Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 1316-1320 (1973).
14. Lapeyre, B., Bourbon, H. & Amalric, F. Nucleolin, the Major Nucleolar Protein of Growing Eukaryotic Cells: An Unusual Protein Structure Revealed by the Nucleotide Sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 1472-1476 (1987).

15. Pasternack, M., Bleier, K. & McInerney, T. Granzyme A binding to target cell proteins. Granzyme A binds to and cleaves nucleolin in vitro. *J. Biol. Chem.* 266, 14703-14708 (1991).
16. Chen, C., Chiang, S. & Yeh, N. Increased stability of nucleolin in proliferating cells by inhibition of its self-cleaving activity. *J. Biol. Chem.* 266, 7754-7758 (1991).
- 5 17. Fang, S.-H. & Yeh, N.-H. The Self-Cleaving Activity of Nucleolin Determines Its Molecular Dynamics in Relation to Cell Proliferation. *Exp. Cell Res.* 208, 48-53 (1993).
18. Srivastava, M. & Pollard, H. B. Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights. *FASEB J.* 13, 1911-1922 (1999).
- 10 19. Ginisty, H., Sicard, H., Roger, B. & Bouvet, P. Structure and functions of nucleolin. *J. Cell Sci.* 112, 761-772 (1999).
20. Borer, R. A., Lehner, C. F., Eppenberger, H. M. & Nigg, E. A. Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell* 56, 379-390 (1989).
21. Callebaut, C. et al. Identification of V3 Loop-binding Proteins as Potential Receptors Implicated in the Binding of HIV Particles to CD4+ Cells. *J. Biol. Chem.* 273, 21988-21997 (1998).
- 15 22. Shibata, Y. et al. Nuclear Targeting by the Growth Factor Midkine. *Mol. Cell Biol.* 22, 6788-6796 (2002).
23. de Verdugo, U. et al. Characterization of a 100-kilodalton binding protein for the six serotypes of coxsackie B viruses. *J. Virol.* 69, 6751-6757 (1995).
24. Folkman, J. What is the role of endothelial cells in angiogenesis? *Lab. Invest.* 51, 601-604 (1984).
25. Marshak, D. R., Kadonaga, J. T., Burgess, R. R. & Knuth, M. W. Strategies for protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1996).
- 20 26. Wickstrom, S. A., Alitalo, K. & Keski-Oja, J. Endostatin Associates with Lipid Rafts and Induces Reorganization of the Actin Cytoskeleton via Down-regulation of RhoA Activity. *J. Biol. Chem.* 278, 37895-37901 (2003).
27. Christian, S. et al. Nucleolin expressed at the cell surface is a marker of endothelial cells in angiogenic blood vessels. *J. Cell Biol.* 163, 871-878 (2003).
- 25 28. Gillespie, G. Y., Soroceanu, L., Manning, T. J. Jr., Gladson, C. L. & Rosenfeld, S. S. Glioma Migration Can Be Blocked by Nontoxic Inhibitors of Myosin II. *Cancer Res.* 59, 2076-2082 (1999).
29. Chavrier, P. May the force be with you: Myosin-X in phagocytosis. *Nat. Cell Biol.* 4, E169-71 (2002).
30. Wylie, S. R. & Chantler, P. D. Separate but linked functions of conventional myosins modulate adhesion and neurite outgrowth. *Nat. Cell Biol.* 3, 88-92 (2001).
- 30 31. Mehta, A. Myosin learns to walk. *J. Cell Sci.* 114, 1981-1998 (2001).
32. Deng, J. S., Ballou, B. & Hofmeister, J. K. Internalization of anti-nucleolin antibody into viable HEP-2 cells. *Mol. Biol. Rep.* 23, 191-195 (1996).
33. Bouche, G., Baldin, V., Belenguer, P., Prats, H. & Amalric, F. Activation of rDNA transcription by FGF-2: key role of protein kinase CKII. *Cell Mol. Biol. Res.* 40, 547-554 (1994).
- 35 34. Bonnet, H. et al. Fibroblast Growth Factor-2 Binds to the Regulatory beta Subunit of CK2 and Directly Stimulates CK2 Activity toward Nucleolin. *J. Biol. Chem.* 271, 24781-24787 (1996).
35. Bouche, G. et al. Basic Fibroblast Growth Factor Enters the Nucleolus and Stimulates the Transcription of Ribosomal Genes in ABAE Cells Undergoing G0→G1 Transition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 6770-6774 (1987).
36. Sudhakar, A. et al. Human tumstatin and human endostatin exhibit distinct antiangiogenic activities mediated by α v β 3 and α 5 β 1 integrins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 4766-4771 (2003).
- 40 37. Folkman, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* 1, 27-31 (1995).
38. Sasaki, T., Hohenester, E. & Timpl, R. Structure and function of collagen-derived endostatin inhibitors of angiogenesis. *IUBMB Life* 53, 77-84 (2002).
39. Sasaki, T. et al. Structural basis and potential role of heparin/heparan sulfate binding to the angiogenesis inhibitor endostatin. *EMBO J.* 18, 6240-6248 (1999).
- 45

40. Kreuger, J. et al. Role of heparan sulfate domain organization in endostatin inhibition of endothelial cell function. *EMBO J.* 21, 6303-6311 (2002).
41. Li, B., Wu, X., Zhou, H., Chen, Q. & Luo, Y. Acid- induced unfolding mechanism of recombinant human endostatin. *Biochemistry* 43, 2550-2557 (2004)
- 5 42. Wu, X., Huang, J., Chang, G. & Luo, Y. Detection and characterization of an acid-induced folding intermediate of endostatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 973-978 (2004).
43. Meredith J. E. Jr., Fazeli. B. & Schwartz M. A. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol. Biol. Cell* 4, 953-61 (1993).
44. Dhanabal, M. et al. Endostatin Induces Endothelial Cell Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274, 11721-11726 (1999).
- 10 45. Sengupta, T. K., Bandyopadhyay, S., Fernandes, D. J. & Spicer, E. K. Identification of Nucleolin as an AU-rich Element Binding Protein Involved in bcl-2 mRNA Stabilization. *J. Biol. Chem.* 279, 7. 10855-10863 (2004).
46. Maeshima, Y., Colorado, P. C. & Kalluri, R. Two RGD-independent α v β 3 Integrin Binding 8. Sites on Tumstatin Regulate Distinct Anti-tumor Properties. *J. Biol. Chem.* 275, 23745-23750 (2000).
47. Sui, G. et al. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 5515-5520 (2002).
- 15 48. Sastry, S. K. & Burridge, K. Focal Adhesions: A Nexus for Intracellular Signaling and Cytoskeletal Dynamics. *Exp. Cell Res.* 261, 25-36 (2000)

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar la probabilidad de éxito del tratamiento contra el cáncer con endostatina en un sujeto, que comprende:
 - a. detectar selectivamente una muestra de dicho sujeto por el nivel de expresión de nucleolina; y
 - 5 b. determinar si dicho sujeto es sensible al tratamiento del cáncer con endostatina basándose en la cantidad de expresión de nucleolina, en donde una mayor cantidad de nucleolina indica una mayor probabilidad de éxito.
2. Método para detectar selectivamente un inhibidor de la angiogénesis específico de la nucleolina eficaz a la hora de inhibir la angiogénesis, que comprende:
 - a. aplicar un ensayo de fijación apropiado a un conjunto de moléculas candidatas, para obtener de ese modo
 - 10 numerosas moléculas específicas de la nucleolina;
 - b. analizar cada una de las muchas moléculas específicas de la nucleolina por su eficacia a la hora de inhibir la angiogénesis mediante un ensayo de antiangiogénesis; y
 - c. seleccionar la molécula específica de la nucleolina resultante que es eficaz a la hora de inhibir la angiogénesis como queda demostrado mediante el ensayo de antiangiogénesis.
- 15 3. Método según la reivindicación 2, en el que el inhibidor de la angiogénesis específico de la nucleolina es una proteína o un péptido.
4. Método según la reivindicación 2, en el que el inhibidor de la angiogénesis específico de la nucleolina es una molécula pequeña.
5. Método según la reivindicación 2, en el que el inhibidor de la angiogénesis específico de la nucleolina se utiliza
- 20 para curar una enfermedad dependiente de la angiogénesis.
6. Método según la reivindicación 5, en el que la enfermedad dependiente de la angiogénesis es cáncer.
7. Método según la reivindicación 5, en el que la enfermedad dependiente de la angiogénesis es una enfermedad de las células endoteliales.
8. Método para seleccionar un inhibidor de la angiogénesis que tiene la capacidad de inhibir la proliferación y/o
- 25 migración endotelial cuando se añade a las células endoteliales en proliferación *in vitro*, que comprende las etapas de:
 - a. utilizar un método farmacéuticamente aceptable para descubrir las moléculas que interaccionan específicamente con la nucleolina como molécula diana;
 - b. analizar las moléculas así obtenidas de la etapa (a) por su eficacia para inhibir la proliferación y/o migración de las
 - 30 células endoteliales; y
 - c. determinar la molécula que inhibe con eficacia la proliferación y/o migración de las células endoteliales, en donde la eficacia de la función antiangiogénica de dicha molécula se compara con la de la endostatina.
9. Método según la reivindicación 8, en el que la molécula específica de la nucleolina es una proteína o un polipéptido.
- 35 10. Método según la reivindicación 8, en el que la molécula específica de la nucleolina es una molécula pequeña.
11. Método para aumentar la receptividad de una célula diana a un inhibidor de la angiogénesis, que comprende:
 - a. introducir una nucleolina exógena en las células diana *in vitro*, para obtener de esta manera numerosas células diana modificadas que expresan la nucleolina exógena; y
 - b. medir la tasa de destrucción de las células diana modificadas debida a la endostatina *in vitro*, en donde un
 - 40 aumento de la tasa de destrucción es indicativa de un aumento de la receptividad de la célula diana.
12. Método según la reivindicación 11, en el que la célula diana es una célula cancerosa.
13. Método según la reivindicación 11, en el que la célula diana es una célula endotelial.
14. Método según la reivindicación 11, en el que dicho inhibidor de la angiogénesis es la endostatina.
15. Método según la reivindicación 11, en el que la nucleolina exógena se introduce en la célula diana mediante un
- 45 vector vírico.

16. Método para potenciar el efecto antiangiogénico de un inhibidor de la angiogénesis en una célula endotelial diana, que comprende:

a. introducir en dicha célula diana una cantidad farmacéuticamente eficaz de la molécula de nucleolina exógena *in vitro*, siendo capaz dicha molécula de nucleolina de expresarse en dicha célula diana; y

5 b. incubar dicha célula diana con dicho inhibidor de la angiogénesis *in vitro*, para provocar de este modo la inhibición del crecimiento de dicha célula diana.

17. Método según la reivindicación 16, en el que dicho inhibidor de la angiogénesis es la endoestatina.

18. Método según la reivindicación 16, en el que dicha célula endotelial diana es una célula endotelial en un tejido canceroso.

10 **19.** Método para determinar la sensibilidad de un paciente al tratamiento con endoestatina, que comprende poner en contacto una muestra de un paciente con un anticuerpo contra la nucleolina, y detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo y la nucleolina, en donde una concentración más alta de la presencia del complejo indica una mayor probabilidad de éxito del tratamiento con endoestatina.

15 **20.** Método para identificar células cancerosas diana que son sensibles a un tratamiento con el inhibidor de la angiogénesis, que comprende:

a. generar un anticuerpo antinucleolina;

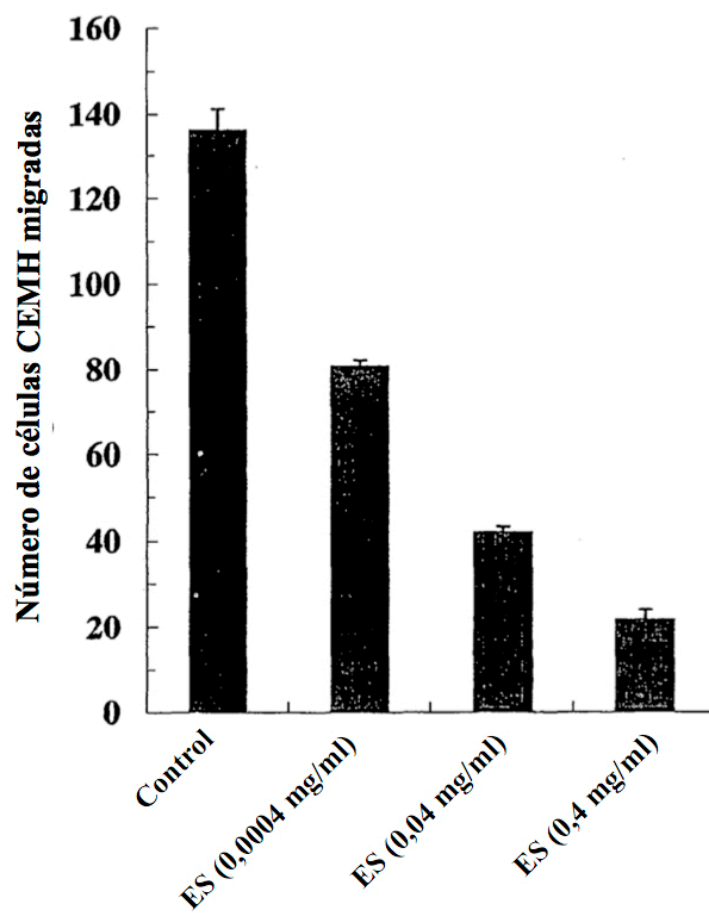
b. poner en contacto una muestra de un sujeto con dicho anticuerpo antinucleolina; y

20 c. identificar las células cancerosas diana que son sensibles al tratamiento con el inhibidor de la angiogénesis como indica el nivel de nucleolina presente en la muestra, en donde una concentración más alta indica una mayor sensibilidad.

21. Método según la reivindicación 20, en el que el anticuerpo antinucleolina es un anticuerpo policlonal.

22. Método según la reivindicación 20, en el que el anticuerpo antinucleolina es un anticuerpo monoclonal.

23. Método según la reivindicación 20, en el que el inhibidor de la angiogénesis es la endoestatina.

a**Ensayo de migración celular****Fig. 1a**

b

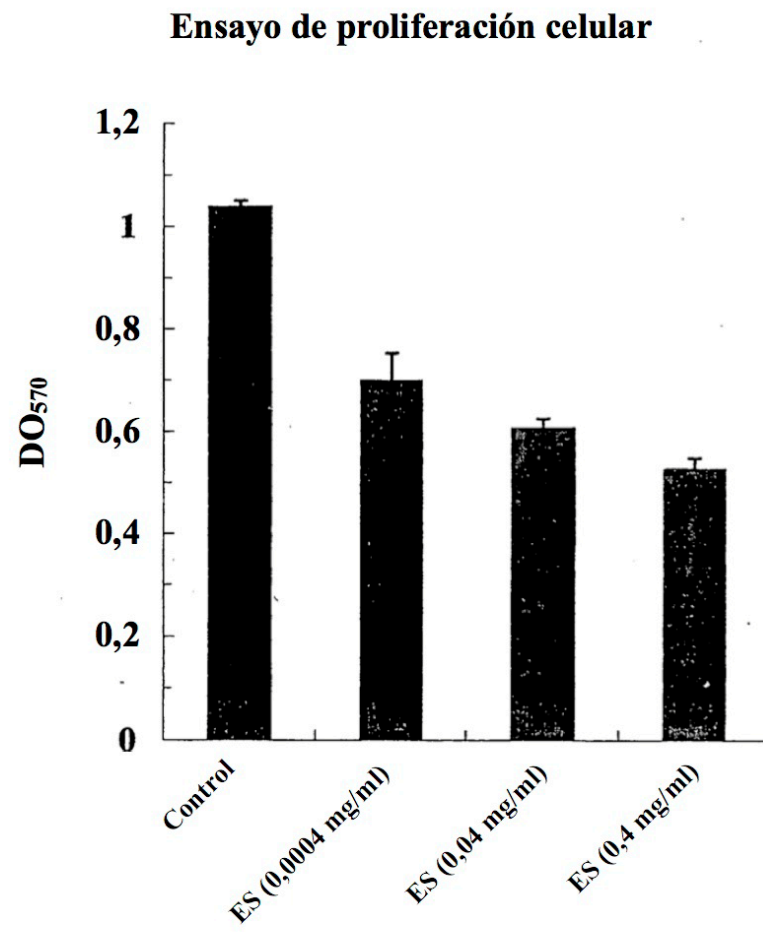


Fig. 1b

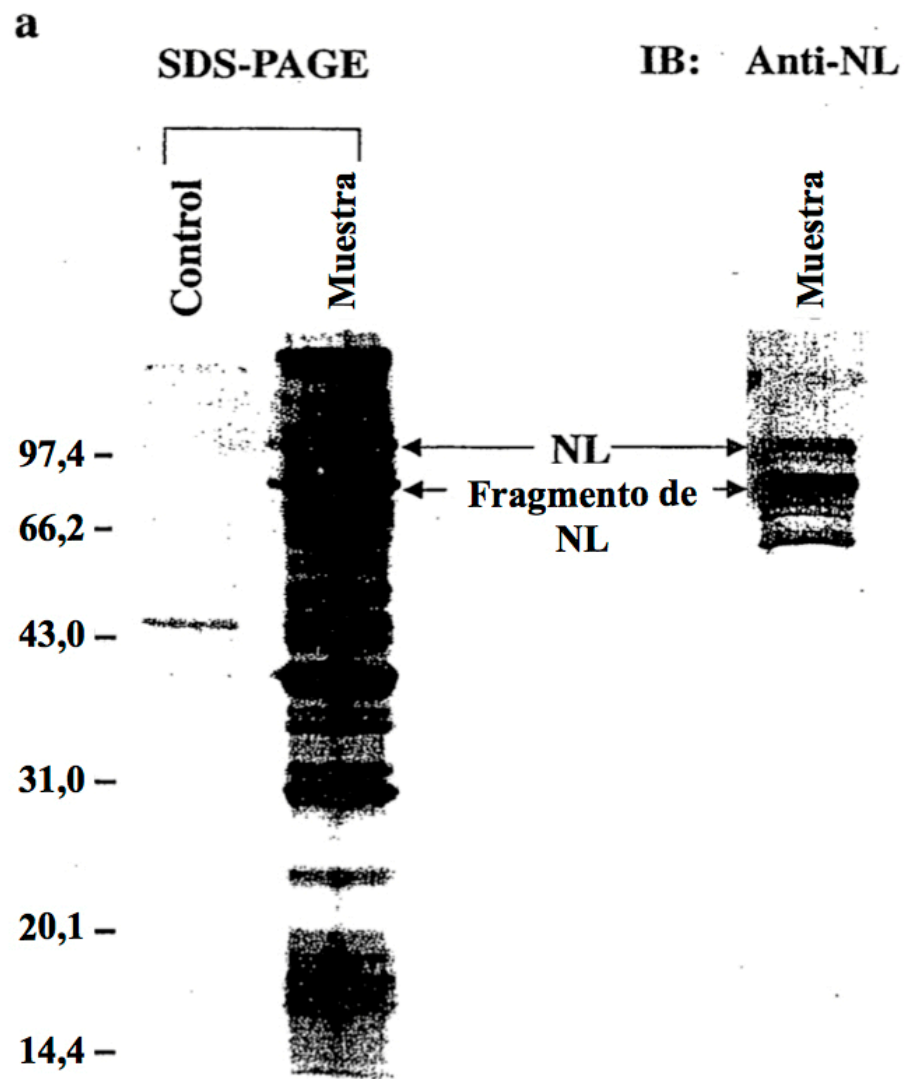


Fig. 2a

b

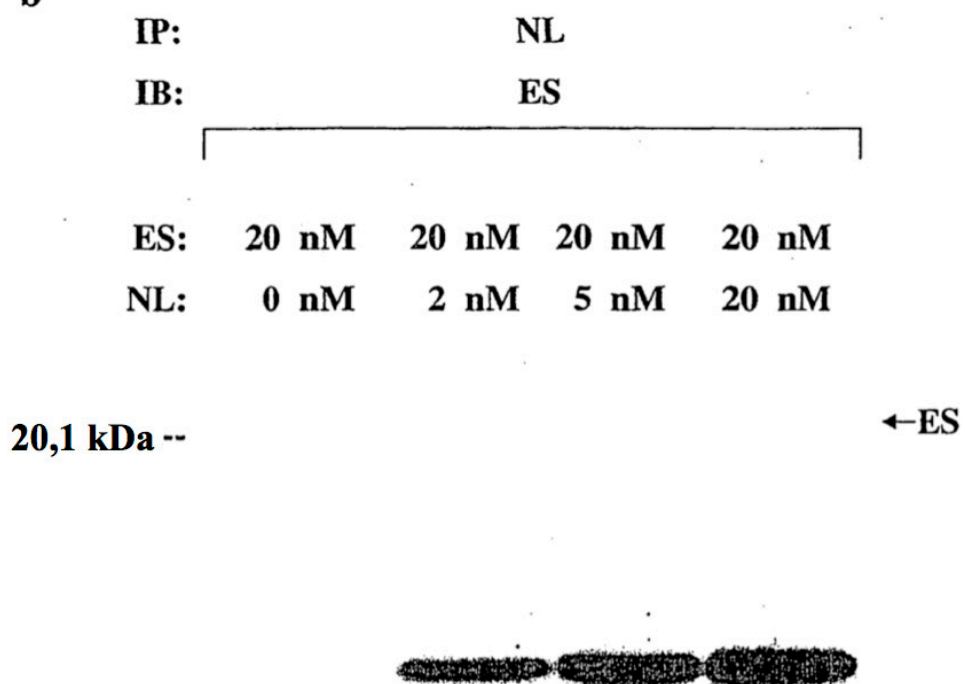


Fig. 2b

c

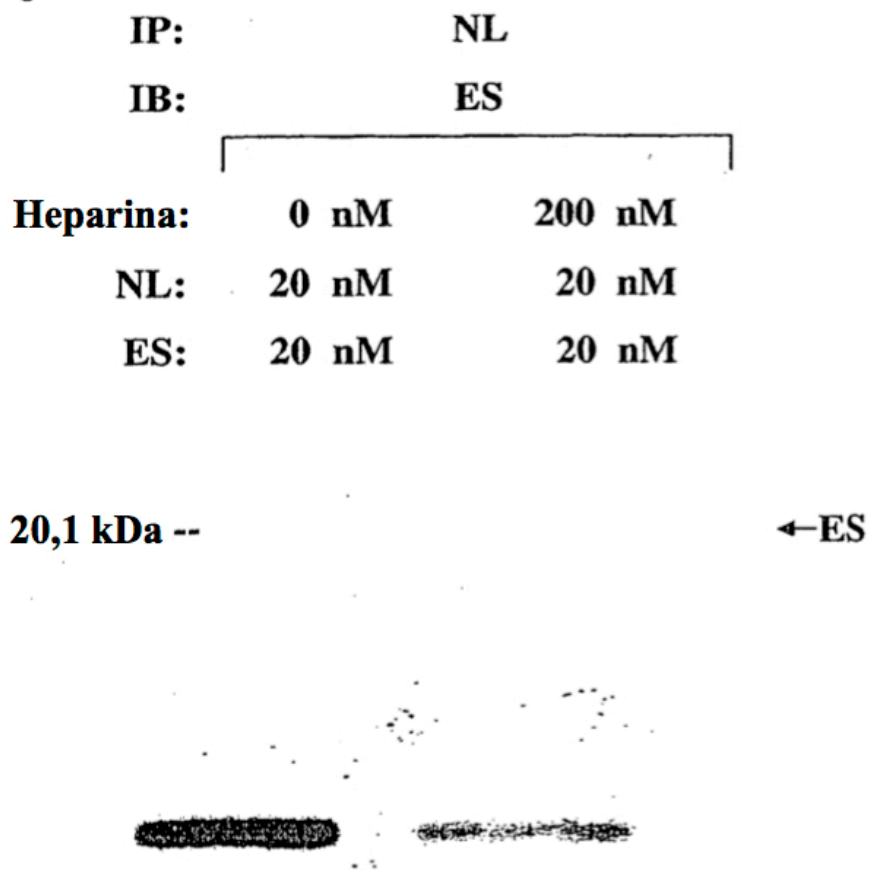


Fig. 2c

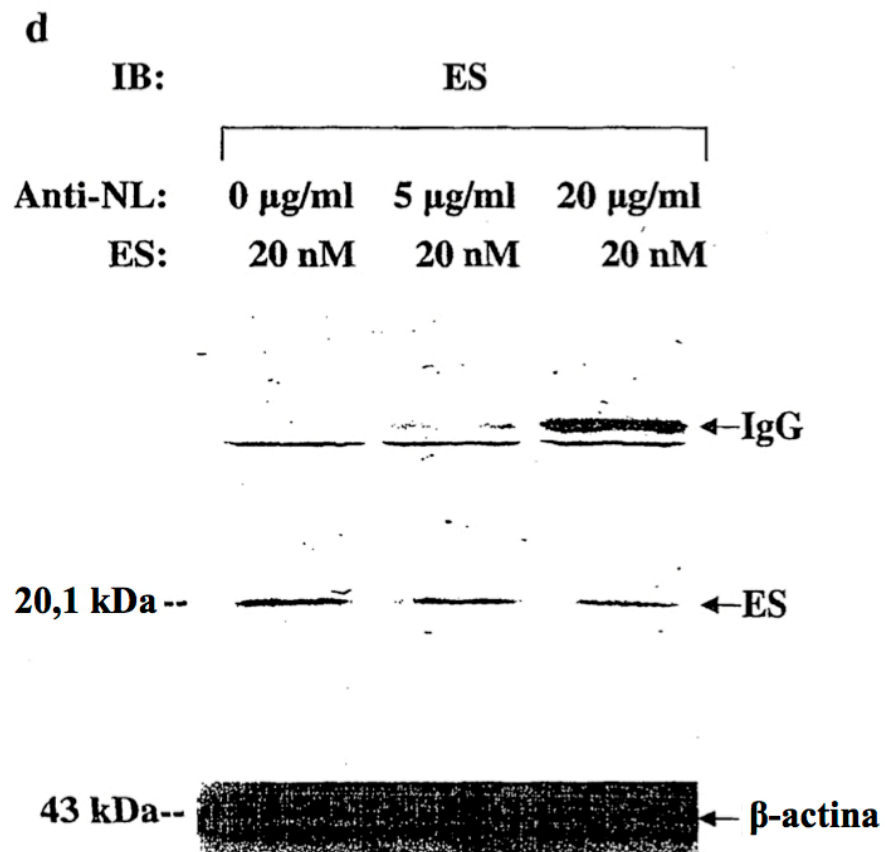


Fig. 2d

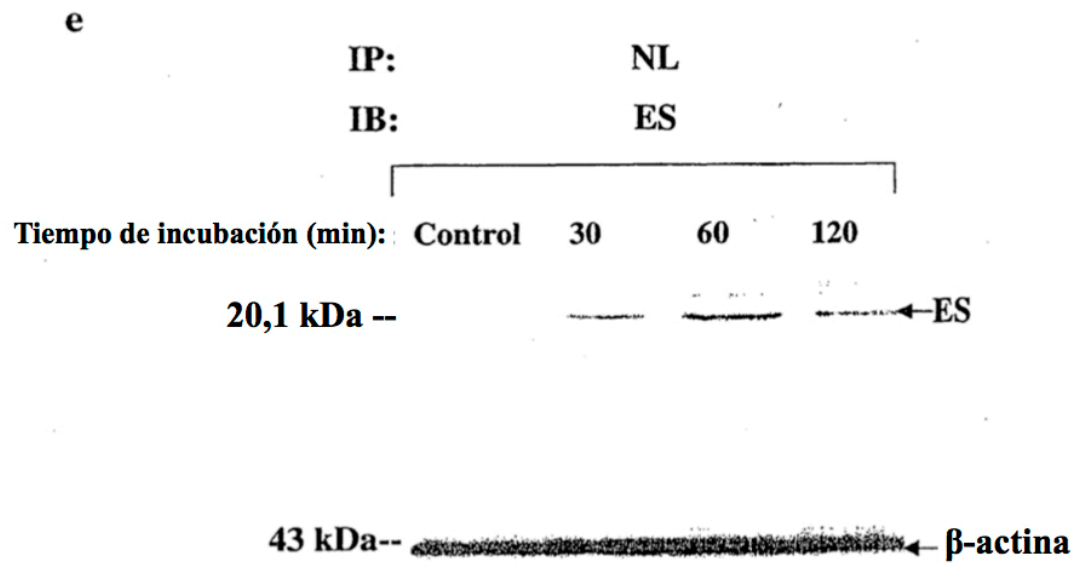


Fig. 2e

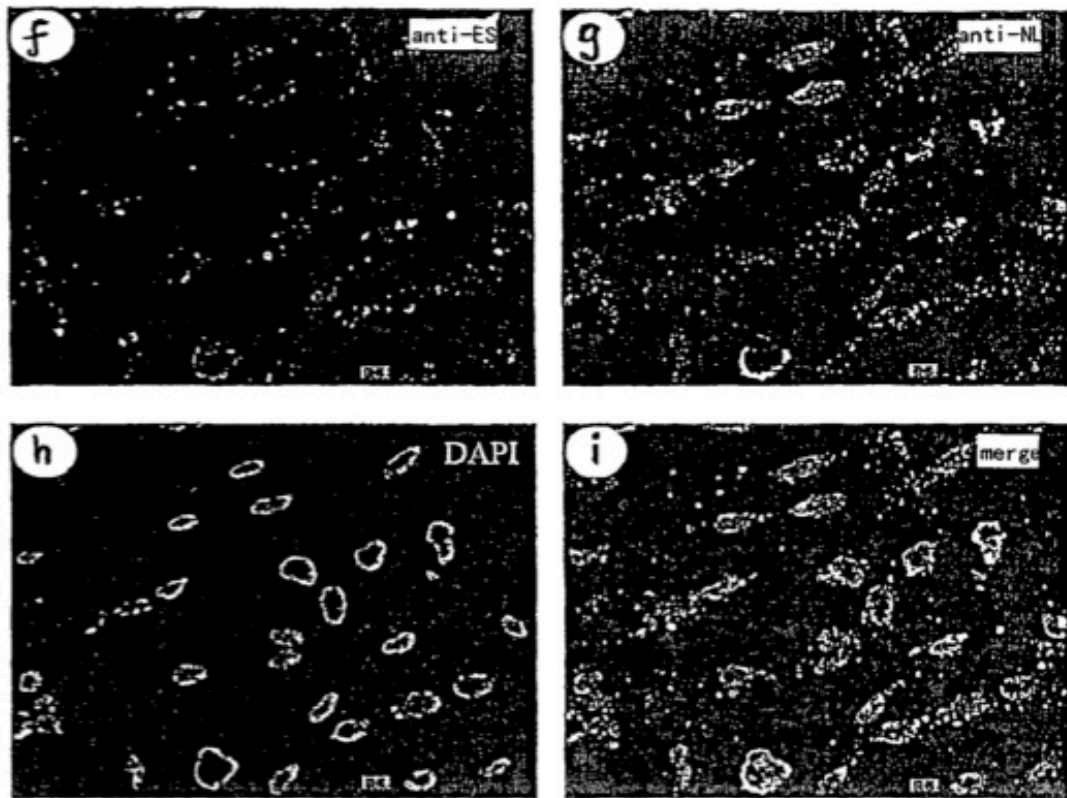


Fig. 2f

a **Ensayo de migración celular de CEVUH**

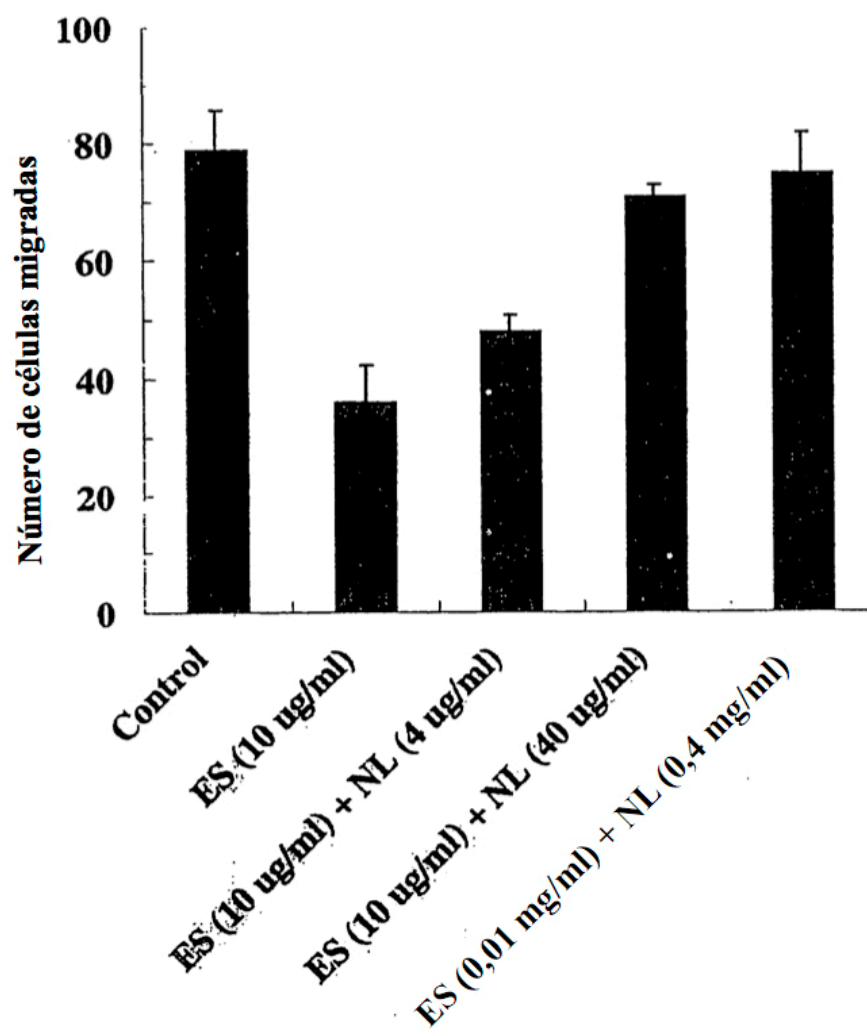


Fig. 3a

b

Ensayo de migración celular

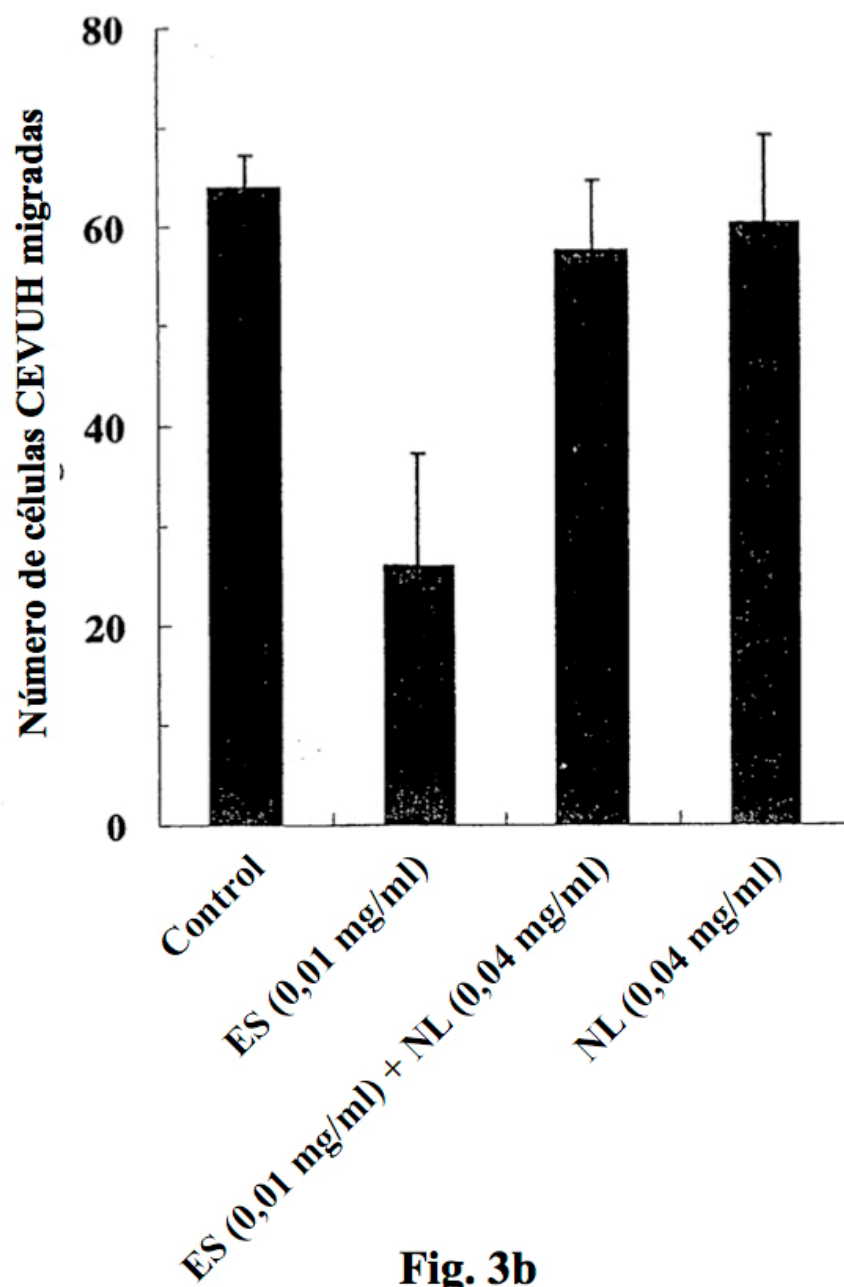
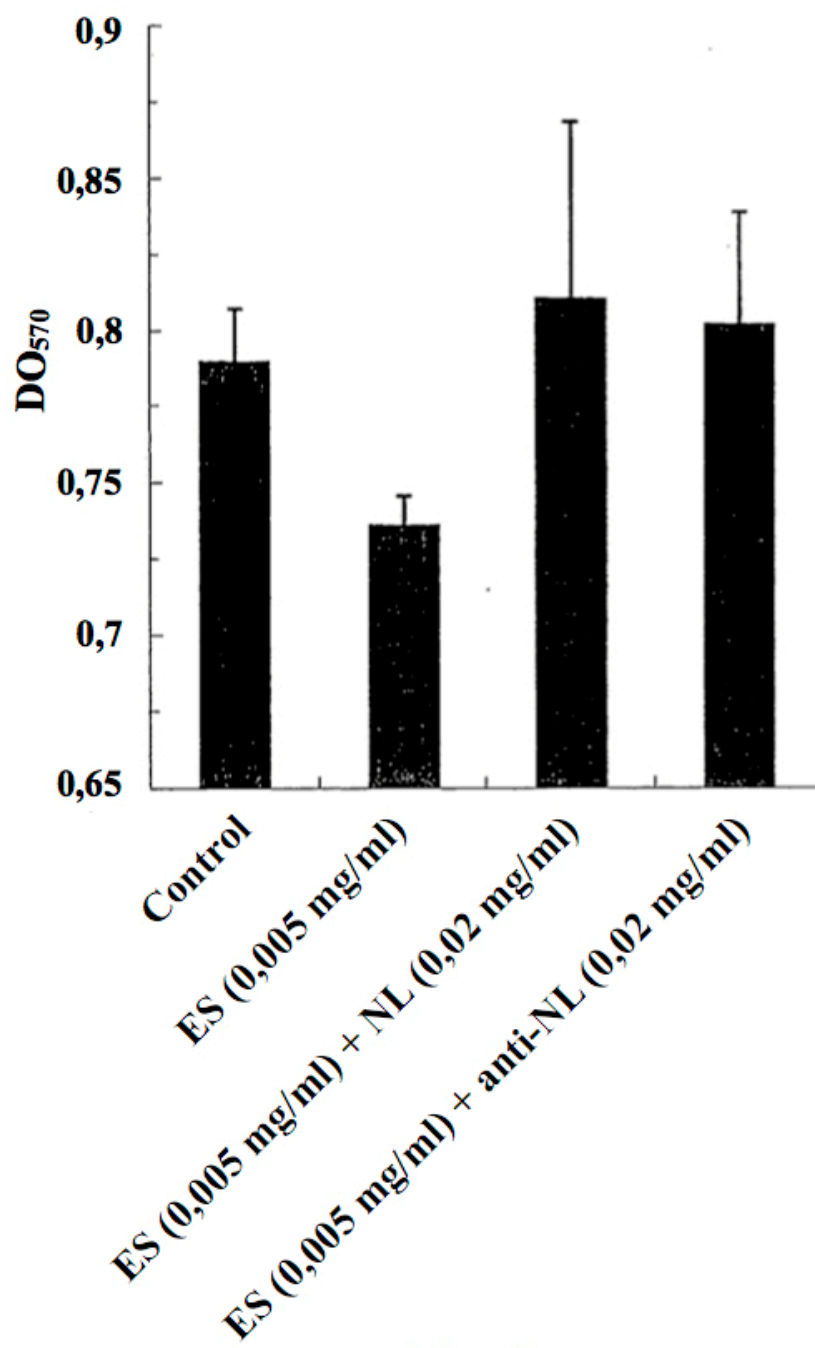
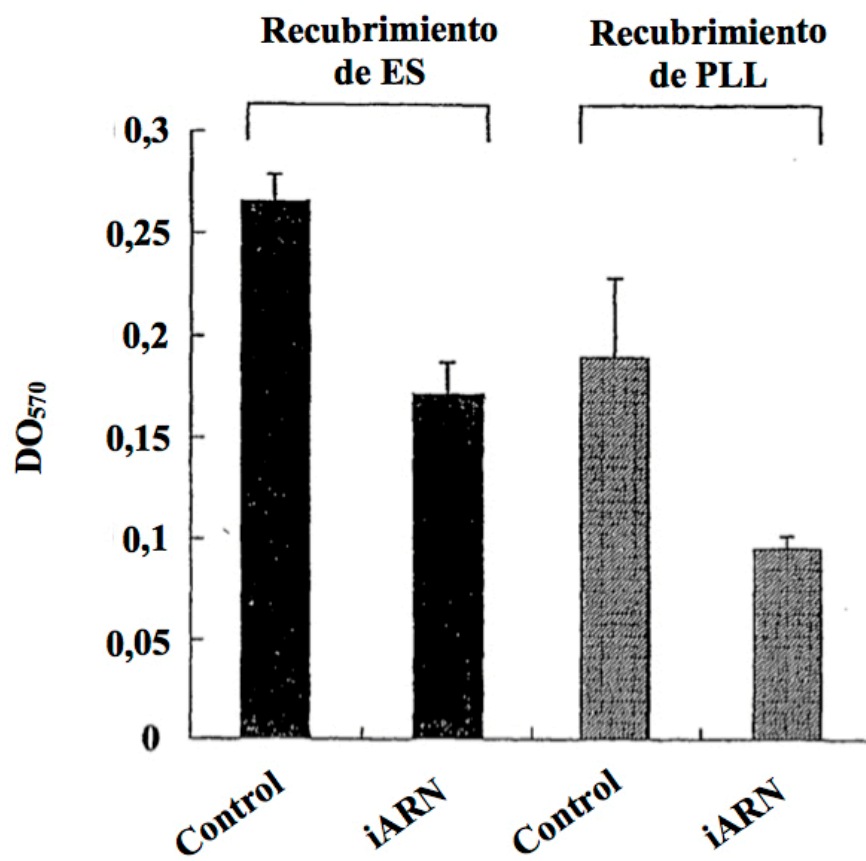


Fig. 3b

c**Ensayo de proliferación celular****Fig. 3c**

d

Ensayo de adhesión celular**Fig. 3d**

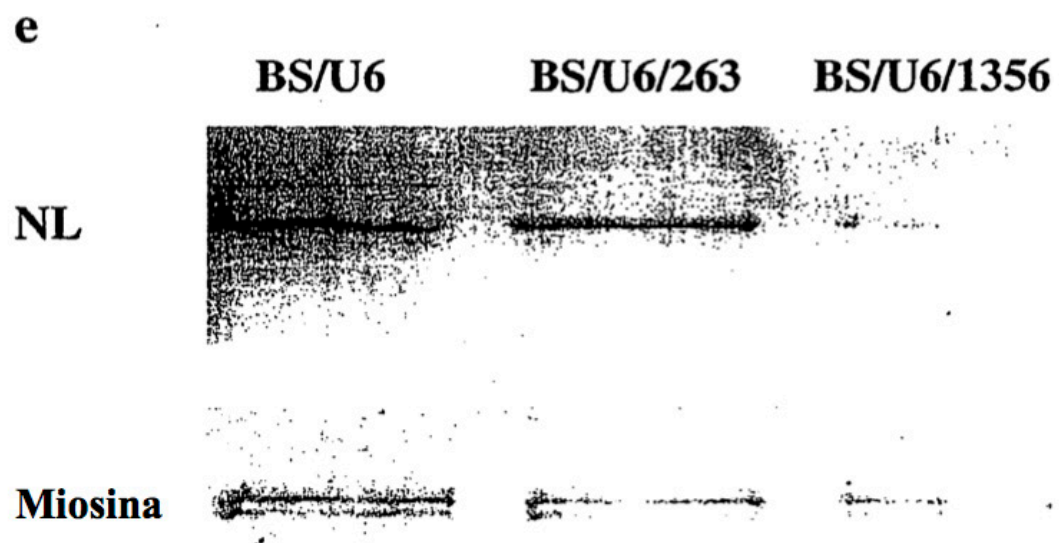


Fig. 3e

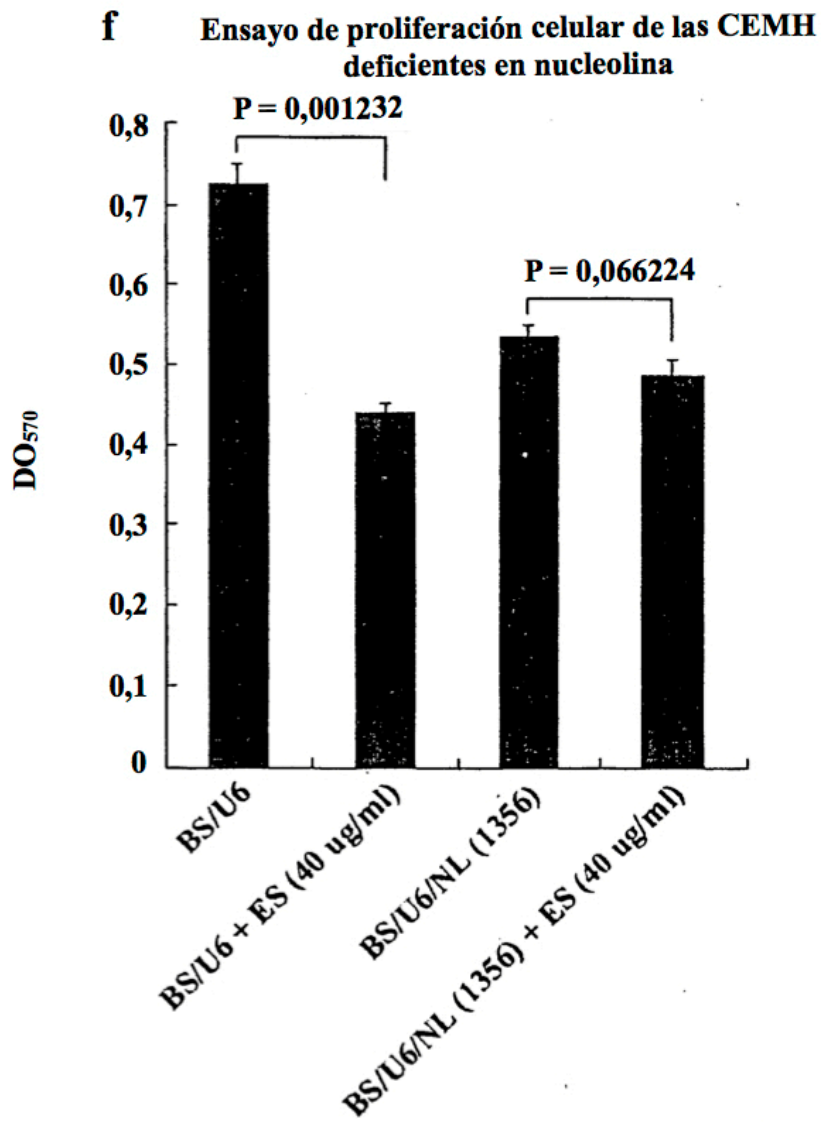


Fig. 3f

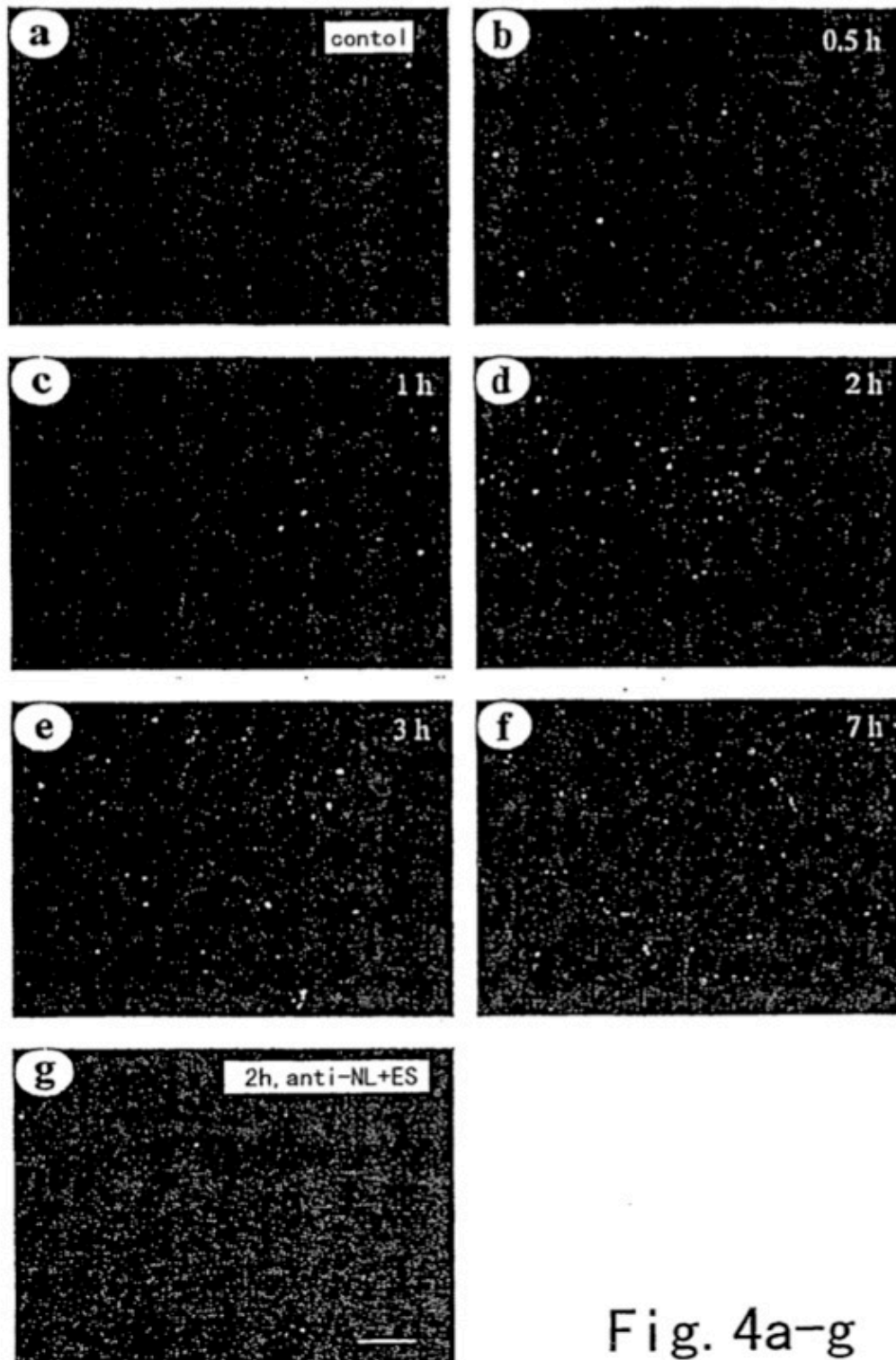


Fig. 4a-g

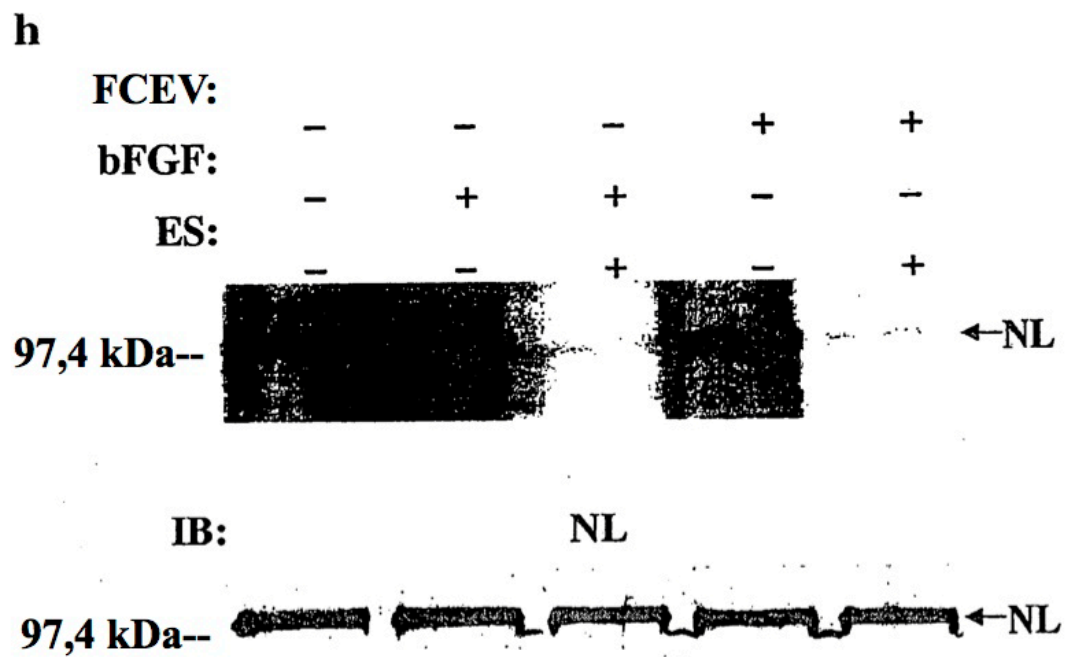


Fig. 4h

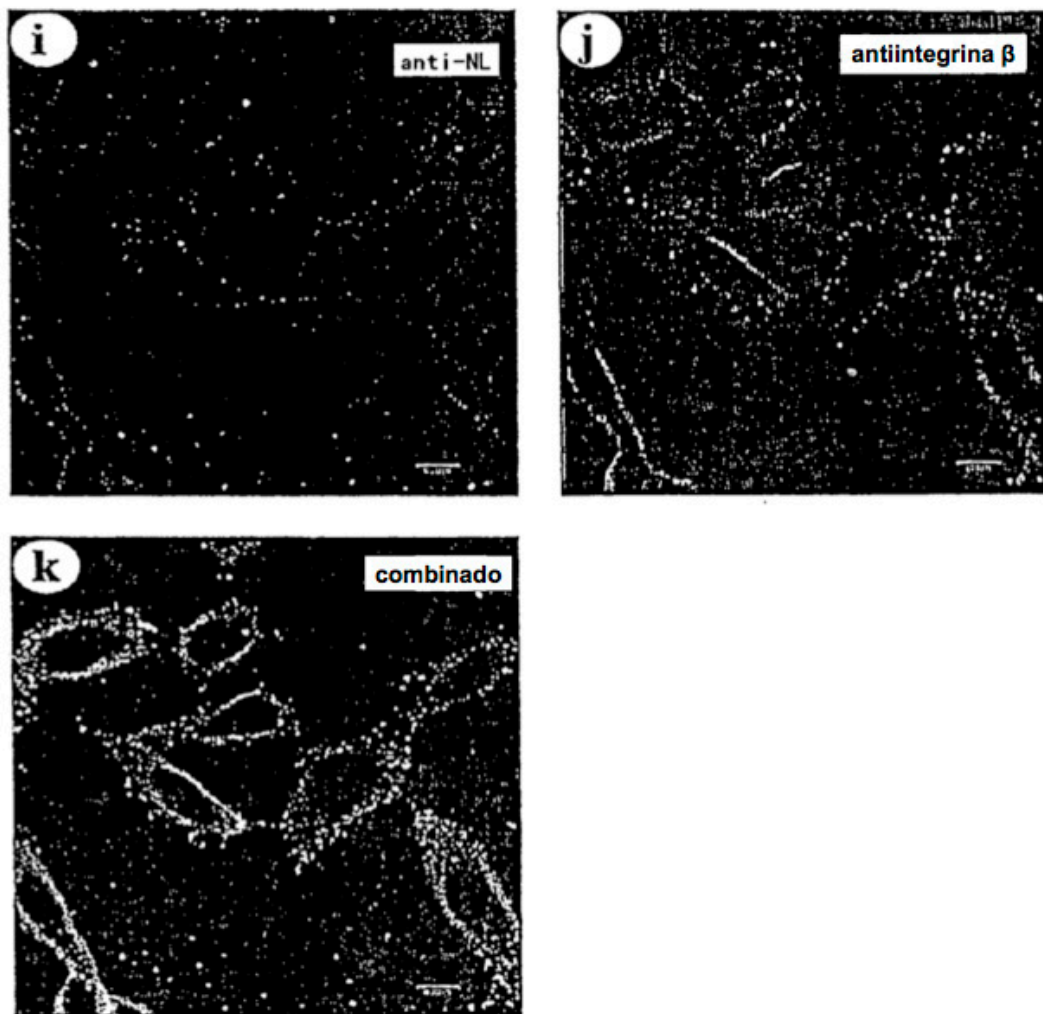


Fig. 4i-k

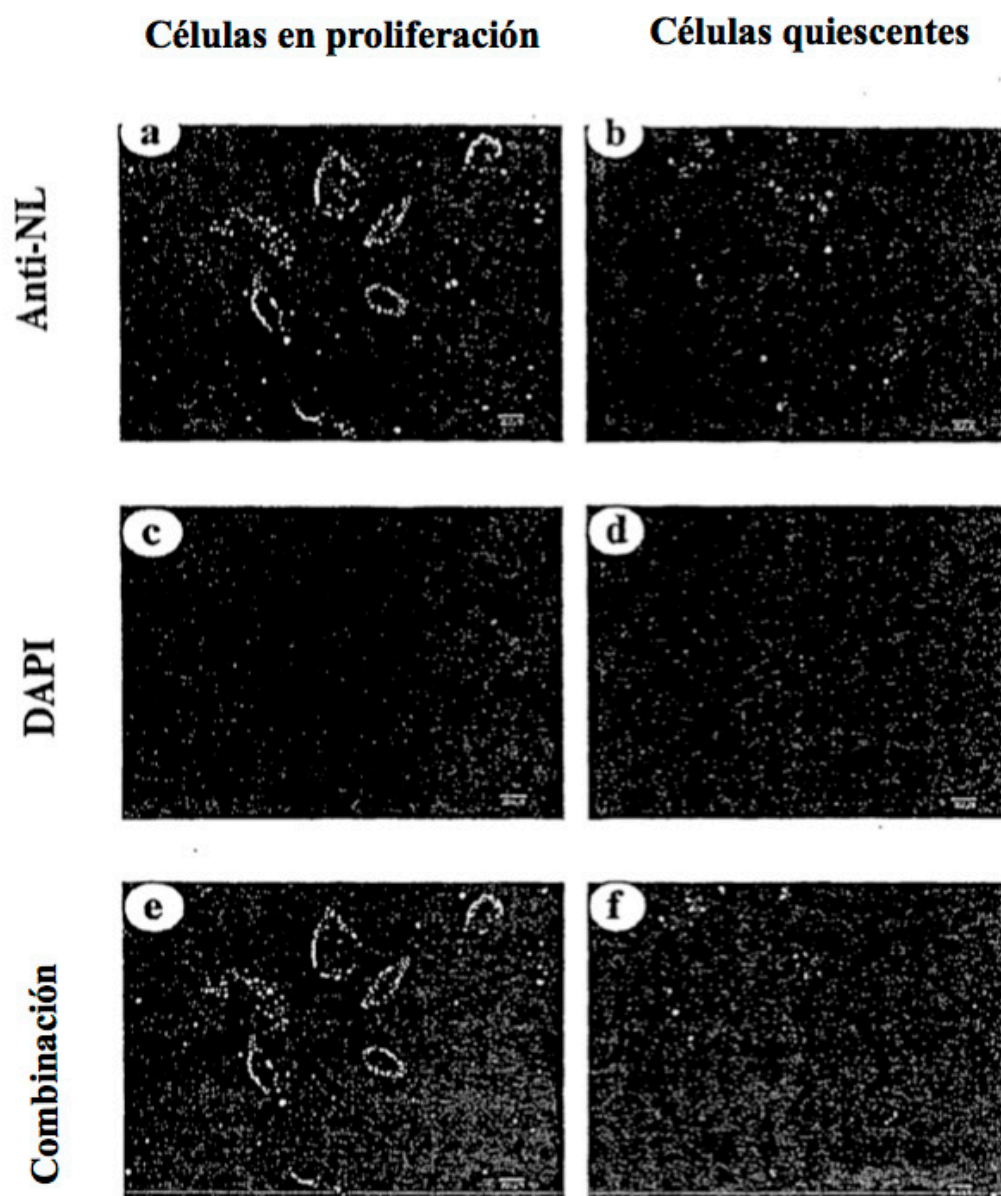
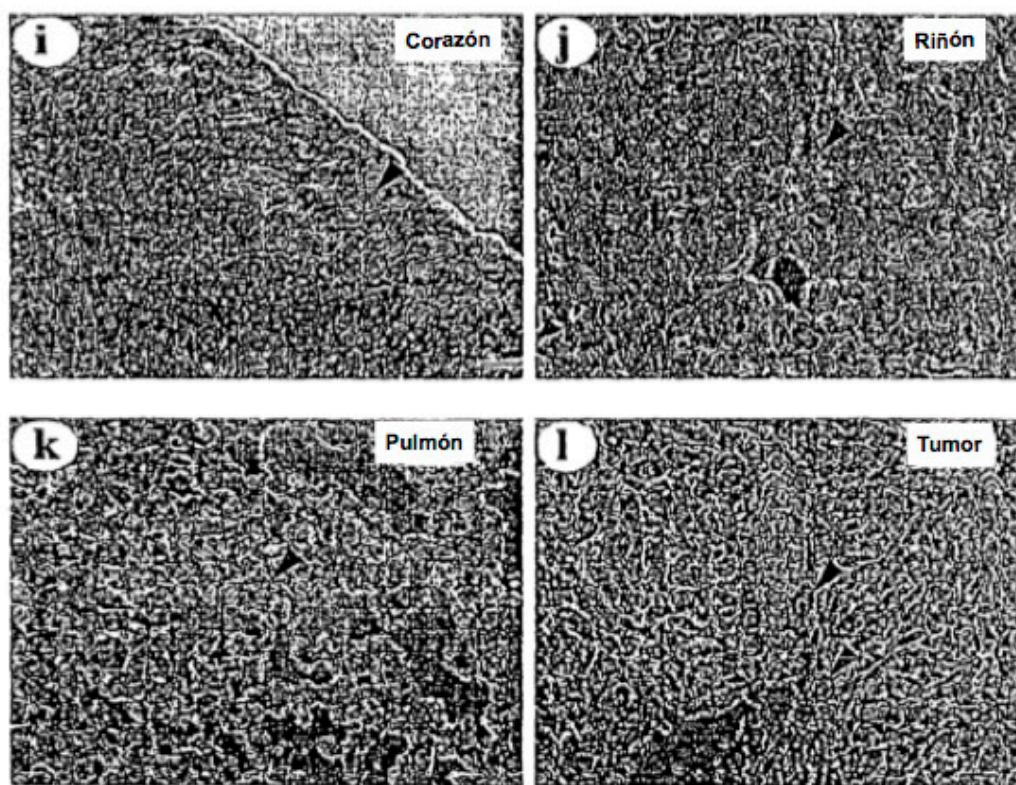
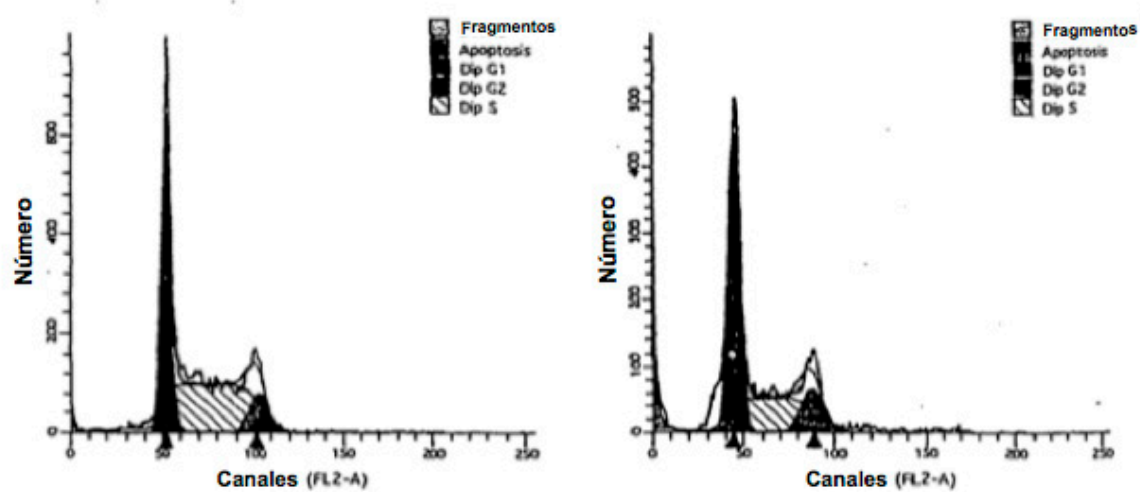


Fig. 5a-f



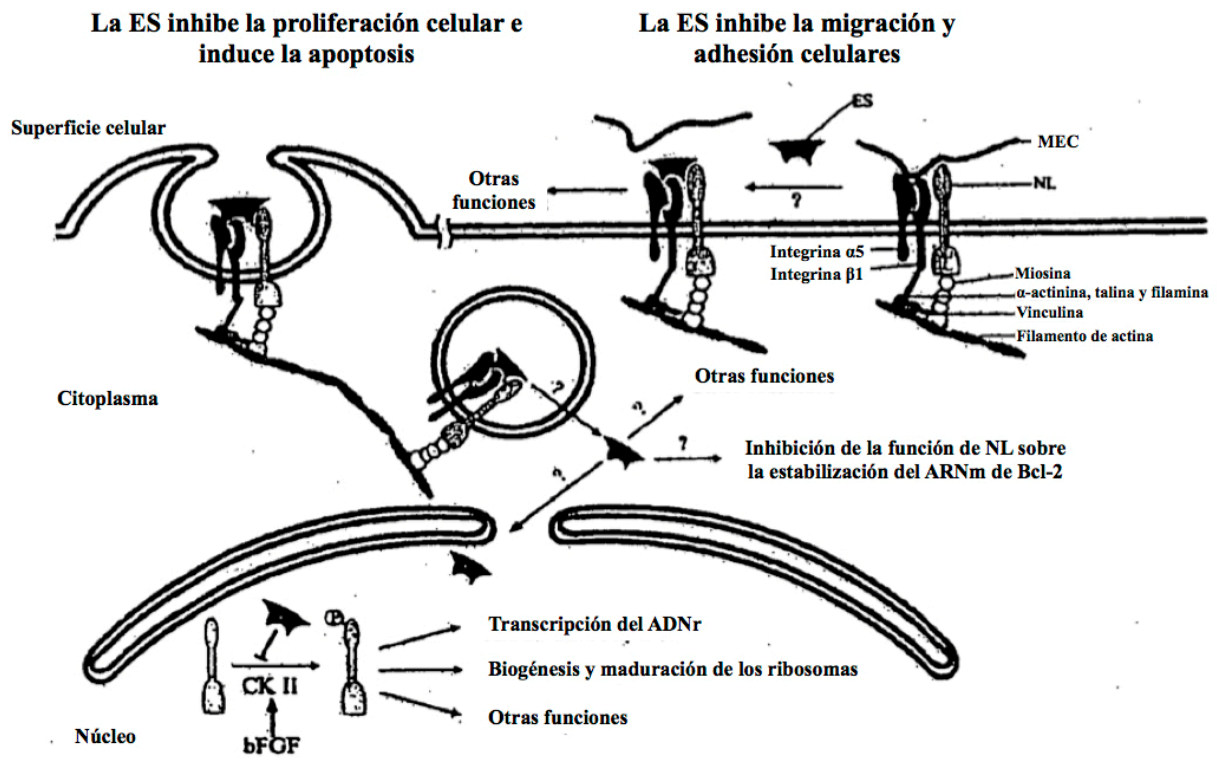


Fig. 6

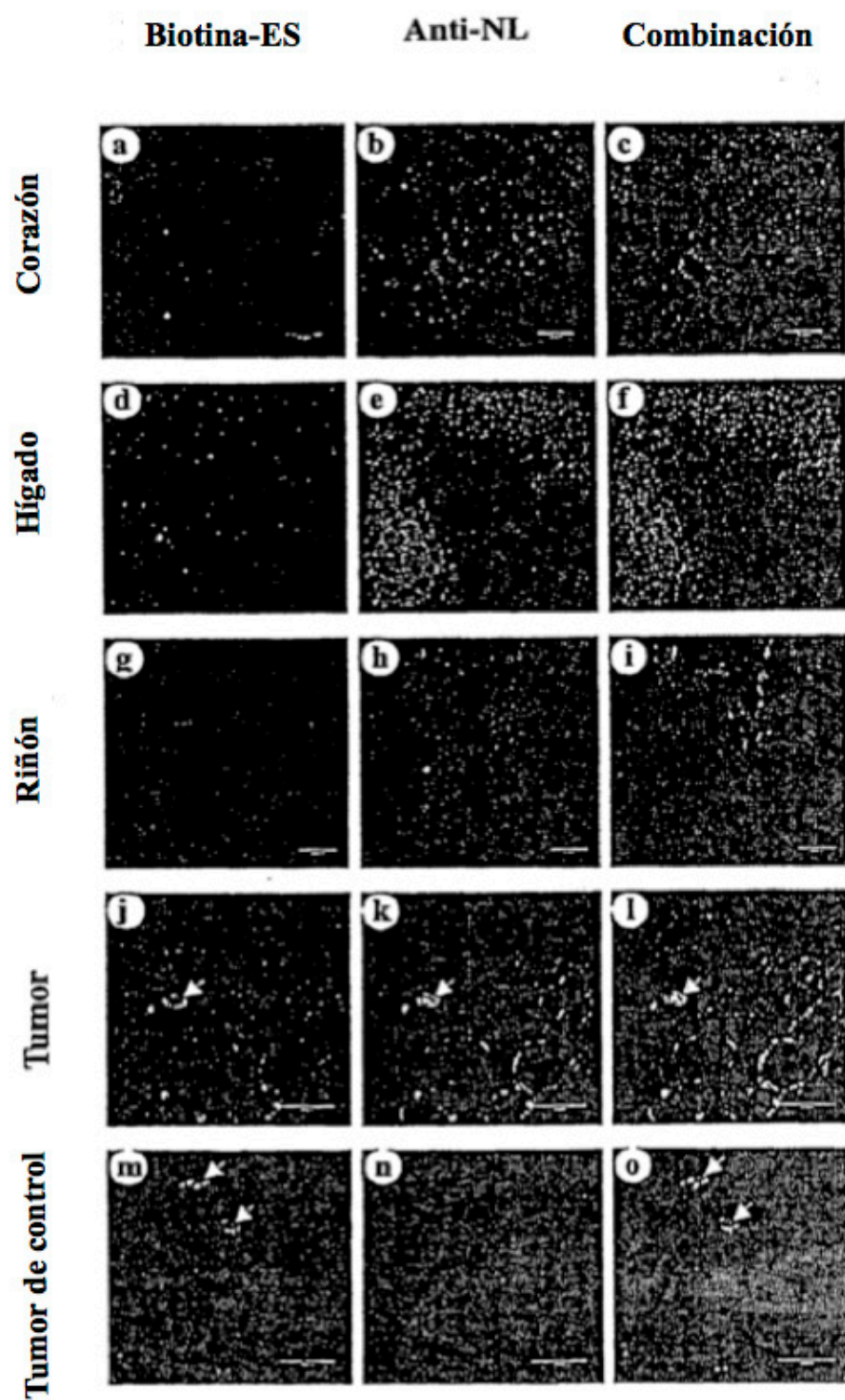


Fig. 7a-o

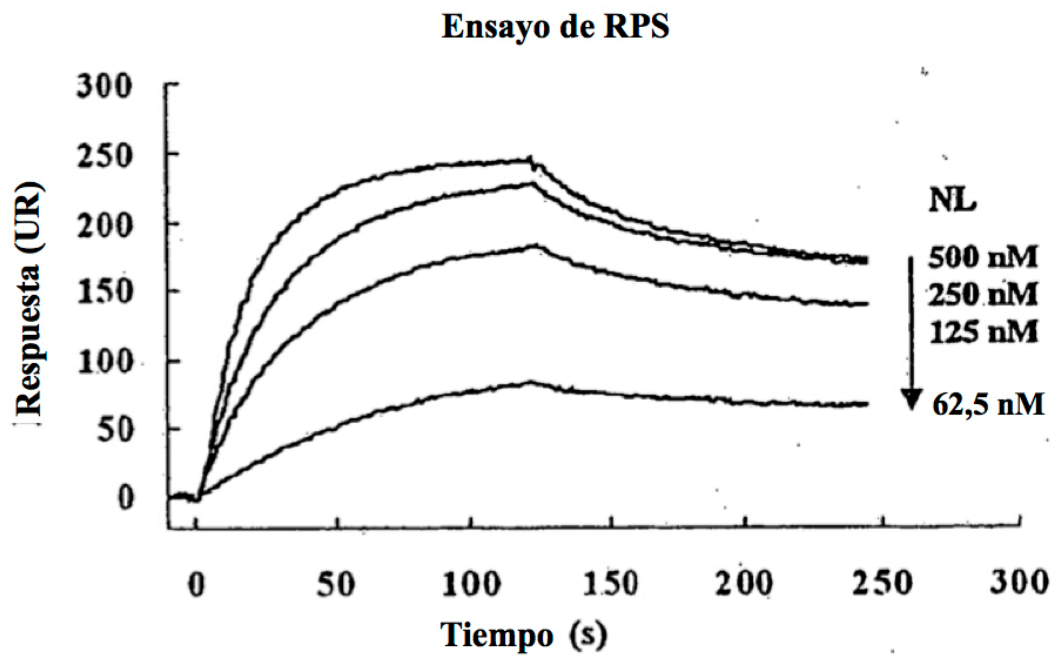


Fig. 8

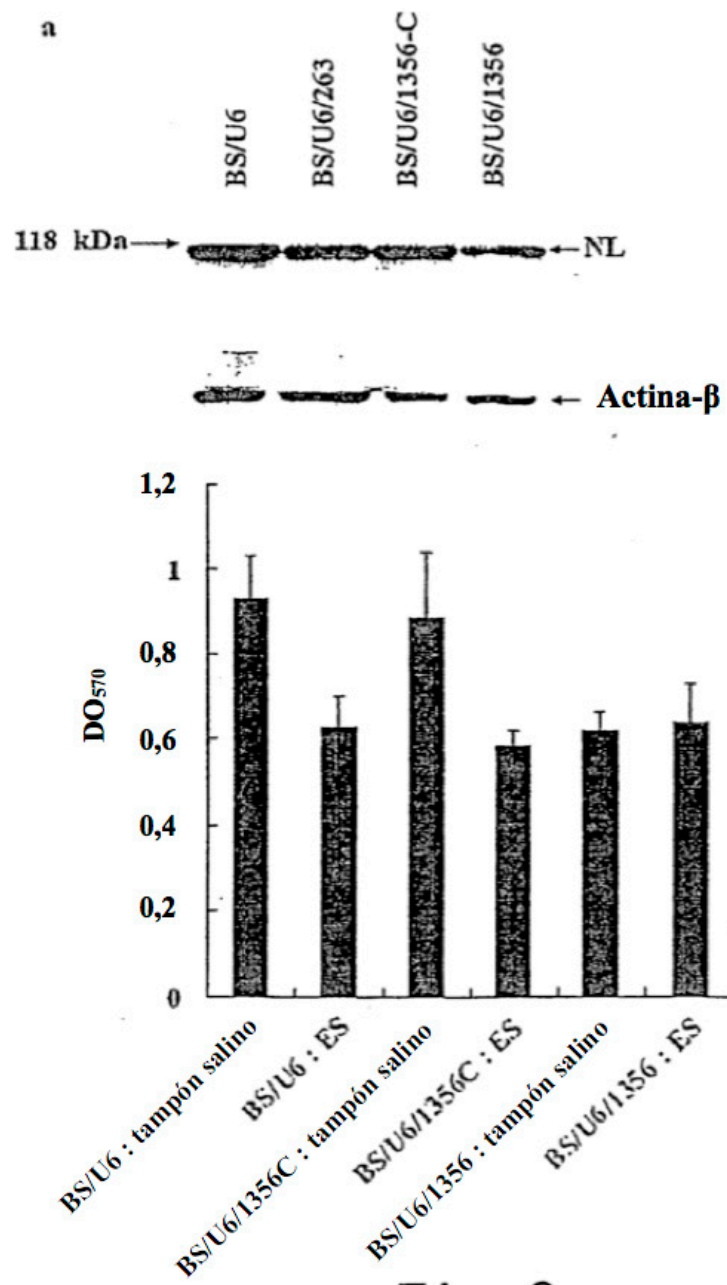


Fig. 9