

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 329**

51 Int. Cl.:  
**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08020754 .1**  
96 Fecha de presentación: **07.08.2001**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2078531**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.07.2009**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas y procedimientos útiles para modular la angiogénesis**

30 Prioridad:  
**08.08.2000 US 223739**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**20.09.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**20.09.2012**

73 Titular/es:  
**TECHNION RESEARCH AND DEVELOPMENT  
FOUNDATION LTD.  
GUTWIRTH SCIENCE PARK TECHNION CITY  
HAIFA 32 000, IL**

72 Inventor/es:  
**Neufeld, Gera;  
Akiri, Gal;  
Vadasz, Zhava y  
Gengrovitch, Stela**

74 Agente/Representante:  
**Carpintero López, Mario**

ES 2 387 329 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Composiciones farmacéuticas y procedimientos útiles para modular la angiogénesis.

**Campo y antecedentes de la invención**

5 La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas y procedimientos útiles para modular la angiogénesis.

En un adulto, la formación de nuevos vasos sanguíneos en tejidos normales o enfermos está regulada por dos procesos, a saber, la vasculogénesis (la transformación de arteriolas preexistentes en pequeñas arterias musculares) y la angiogénesis, el brote de vasos sanguíneos existentes (que se produce en el embrión y en el adulto).

10 El proceso de la angiogénesis está regulado por estímulos biomecánicos y bioquímicos. Los factores angiogénicos, tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF) son liberados por células vasculares, macrófagos y vasos sanguíneos que rodean las células. Estos factores angiogénicos activan proteasas específicas que están implicadas en la degradación de la membrana basal. Como resultado de esta degradación, las células vasculares migran y proliferan de modo que conducen a la formación de un nuevo vaso sanguíneo. Las células periendotheliales, tal como los pericitos en los capilares, las células de músculo liso en los vasos más grandes y los miocitos cardíacos en el corazón son reclutadas para proporcionar funciones de mantenimiento y moduladoras al vaso en formación.

20 El establecimiento y el remodelado de los vasos sanguíneos están controlados por las señales paracrinas, muchas de las cuales están mediadas por los ligandos proteicos que modulan la actividad de los receptores transmembrana de tirosina quinasa. Entre estas moléculas se encuentran el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y sus familias de receptores (VEGFR-1, VEGFR-2, neuropilina-1 y neuropilina-2), angiopoyetinas 1-4 (Ang-1, Ang-2 etc.) y sus respectivos receptores (Tie-1 y Tie-2), el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ).

25 El crecimiento de tumores sólidos está limitado por la disponibilidad de nutrientes y de oxígeno. Cuando las células dentro de los tumores sólidos comienzan a producir factores angiogénicos o cuando los niveles de inhibidores de la angiogénesis disminuyen, se altera el equilibrio entre las influencias antiangiogénicas y angiogénicas, lo que inicia el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir del lecho vascular existente en el tumor. Este acontecimiento en la progresión tumoral se conoce como desplazamiento angiogénico (1,2). Se había demostrado que los inhibidores de la angiogénesis tumoral son capaces de inhibir completamente el crecimiento tumoral en ratones (3,4) y también inhiben la metástasis tumoral, un proceso que depende del estrecho contacto entre la vasculatura y las células tumorales (5). También se ha demostrado que la angiogénesis desempeña un papel importante en la progresión del cáncer de mama (6-9).

Dicho hallazgo ha urgido el uso de factores antiangiogénicos conocidos en la terapia del cáncer de mama (10-12) y una búsqueda de nuevos inhibidores de la angiogénesis.

35 Durante la última década se han aislado varios inhibidores nuevos de la angiogénesis, incluidos los inhibidores de la señalización del VEGF (13) e inhibidores de los procesos que conducen a la maduración y estabilización de nuevos vasos sanguíneos. Los anticuerpos anti-integrina se han usado como inhibidores de la maduración de los vasos sanguíneos (14, 15).

40 Aunque actualmente existen comercialmente varios fármacos anti-angiogénicos, los mecanismos anti-angiogénicos de la mayoría de estos fármacos (p. ej., angiostatina y endostatina) todavía no están claros (16, 17).

Dado que la angiogénesis la pueden iniciar numerosos factores angiogénicos (posiblemente compensatorios), es la razón por la cual los factores antiangiogénicos dirigidos a procesos más tarde en la respuesta angiogénica, tal como la maduración del vaso o una combinación de factores antiangiogénicos, sería lo más eficaz para detener la formación del vaso.

45 El factor 4 plaquetario (PF4) es una proteína antiangiogénica que normalmente se secuestra en las plaquetas (18-20). El PF4 inhibe la angiogénesis usando mecanismos mal definidos (21-24). Anteriormente se especuló que el PF4 se une a los proteoglicanos heparán-sulfato de superficie celular y, de este modo, inhibe la actividad de los factores de crecimiento angiogénicos tal como el factor de crecimiento básico de fibroblastos (24).

50 Reduciendo la presente invención a la práctica y buscando factores o dianas antiangiogénicos alternativos, los presentes inventores han descubierto una nueva proteína de unión a PF4 que participa en la modulación de la angiogénesis.

Como ha demostrado el presente estudio, esta proteína, que en el presente documento se denomina LOR-1, se expresa mucho en células endoteliales cultivadas además de en otras células de vasos sanguíneos. Además, los niveles de expresión de LOR-1 se pueden correlacionar con las propiedades metastásicas de las líneas celulares

derivadas de cáncer de mama, lo que indica que LOR-1 puede desempeñar papeles adicionales en la progresión del tumor además de un papel en la angiogénesis.

### **Sumario de la invención**

5 De acuerdo con un aspecto de la presente invención se proporciona una composición farmacéutica útil para tratar un trastorno que se caracteriza por una excesiva formación de vasos sanguíneos, en la que la composición comprende una molécula capaz de regular por disminución un nivel y/o la actividad de LOR-1, como se define en las reivindicaciones.

10 De acuerdo con características adicionales de la invención que se describen más adelante, la molécula es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de unirse a, y al menos parcialmente inhibir la actividad de, el al menos un polipéptido.

De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones descritas preferidas, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo está dirigido contra al menos una porción del polipéptido establecido en la SEC ID N° 2.

De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones descritas preferidas, la molécula es un polinucleótido capaz de regular por disminución la expresión de al menos un tipo de lisil oxidasa.

15 De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones descritas preferidas, el polinucleótido es al menos parcialmente complementario al polinucleótido establecido en las SEC ID N° 1, 4, 5 o 7.

De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones descritas preferidas, el polipéptido que se va a regular por disminución tiene una homología de al menos 75 % con el polipéptidos establecidos en la SEC ID N° 2.

20 La presente invención aborda con éxito las limitaciones de las configuraciones conocidas actualmente proporcionando composiciones farmacéuticas y procedimientos que se pueden usar para tratar trastornos caracterizados por una excesiva formación de vasos sanguíneos.

### **Breve descripción de las figuras**

25 En el presente documento se describe la invención únicamente a modo de ejemplo, con referencia a las figuras adjuntas. Con referencia específica a las figuras con detalle, se subraya que los rasgos concretos mostrados son únicamente como ejemplo y para los fines de la discusión ilustrativa de las realizaciones preferidas de la presente invención y se presentan con el fin de proporcionar lo que se cree que es la descripción más útil y más fácilmente entendible de los principios y aspectos conceptuales de la invención. A este respecto no se pretende mostrar detalles estructurales de la invención con mayor detalle de lo necesario para una comprensión fundamental de la invención, poniendo de manifiesto para los expertos en la técnica la descripción, tomada con las figuras, el modo como se pueden abordar en la práctica varias formas de la invención.

En las figuras:

35 La FIG. 1 ilustra el análisis SDS-PAGE de extractos de células endoteliales aórticas porcinas (células PAE) que se transfeccionaron con un vector solo (calle 1) o con un vector que contiene el ADNc de LOR-1 (calle 3) y están marcadas metabólicamente con <sup>35</sup>Smetionina. Los extractos de las células transfeccionadas con el vector (calle 2) de las células transfeccionadas con ADNc de LOR-1 (calle 4) o de células endoteliales de la vena umbilical marcada con <sup>35</sup>Smetionina (HUVEC) (calle 5) se purificaron en una columna de afinidad con PF4. Una banda que corresponde en tamaño con la banda original observada en HUVEC es evidente (comparar las calles 4 y 5); esta banda está ausente en los extractos de células transfeccionadas con vector.

40 La FIG. 2 ilustra la expresión diferencial de LOR-1 en células derivadas de cáncer de mama de diferente potencial metastásico. El potencial metastásico de las células aumenta de izquierda a derecha y se correlaciona con el incremento de la expresión del ARNm de LOR-1. Los resultados corresponden al análisis de transferencia Northern de la expresión del ARNm de LOR-1. Los datos sobre el potencial metastásico relativo de las líneas celulares procedían de la literatura.

45 La FIG. 3 ilustra la expresión de LOR-1 recombinante en células de cáncer de mama MCF-7 (calle 1). Las células MCF7 transfeccionadas con vector (Calle 2) y dos clones de MCF-7 que expresan LOR-1 recombinante (calle 3, clon 12, calle 4, clon 22) se cultivaron durante dos días en medio sin suero. El medio de un número igual de células se recolectó, se concentró por 30 usando Centricon™ y alícuotas de 10µl se sometieron a electroforesis usando un gel de SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron a nitrocelulosa y la proteína LOR-1 se identificó usando un anticuerpo dirigido contra el extremo C de LOR-1. Se usó un anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina y tinción con NBT-BICP para detectar el anticuerpo primario unido.

55 La FIG. 4 ilustra el tamaño del tumor correlacionado con la expresión de LOR-1. Las células MCF-7 parentales (par), las células MCF-7 transfeccionadas con el vector pCDNA3 solo (vec) y dos células MCF-7 que expresan LOR-1 recombinante (clones 12 y 24) se depositaron bajo la piel de ratones con deficiencias inmunitaria (10<sup>7</sup>/sitio de la inyección) junto con una pastilla de liberación lenta de estrógenos. Para cada tipo de célula implantado se usaron seis animales. El área de los tumores se midió cada pocos días. Las barras

representan la desviación estándar de la media.

Las FIG. 5a-b ilustran la inmunotinción anti-factor-8 de tumores generados por las células MCF-7 transfectadas con el vector de expresión solo (Figura 5a) o con un vector de expresión que contiene el ADNc de LOR-1 (Figura 5b). Se realizó contratinción con hematoxilina-eosina (azul). La invasión de los vasos sanguíneos en la masa tumoral es más abundante en tumores que expresan LOR1 (Figura 5b) en comparación con los tumores generados por las células control que no expresan LOR-1 (Figura 5a).

Las FIG. 6a-d ilustran secciones de hígado de pacientes con enfermedad de Wilson (Figuras 6c-d) y pacientes normales (Figuras 6a-b) usando sondas sentido de LOR-1 (Figuras 6a, 6c) y sondas antisentido (Figuras 6b, 6d). La FIG. 7 ilustra los resultados de una hibridación in situ de una cantidad entera usando una sonda de ADNc de LOR-1 y un embrión de pollo de 4 días. Se observa una fuerte expresión de ARNm de LOR-1 en vasos sanguíneos amnióticos (flecha). La FIG. 8 ilustra la alineación de secuencia de varias lisil oxidasas, incluida la LOR-1.

### **Descripción de las realizaciones preferidas**

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas y procedimientos que se pueden usar para disminuir la angiogénesis. Específicamente, la presente invención se puede usar para suprimir el crecimiento tumoral y la metástasis, además de para tratar trastornos tales como, por ejemplo, artritis, retinopatía diabética, soriasis y vasculitis.

Los principios y operación de la presente invención se pueden entender mejor con referencia a las figuras y descripciones adjuntas.

Antes de explicar al menos una realización de la invención con detalle, debe entenderse que la invención no está limitada en su aplicación a los detalles de la construcción y la disposición de los componentes indicados en la descripción siguiente o ilustrados en las figuras descritas en la sección Ejemplos. La invención puede abarcar otras realizaciones o se puede practicar o llevar a cabo de varias formas. Asimismo, debe entenderse que las expresiones y la terminología empleadas en el presente documento se usan con una finalidad descriptiva y no deben considerarse limitantes.

Como se describe en la sección Ejemplos más adelante, la presente invención ha descubierto una nueva proteína constituyente del proceso angiogénico.

Esta proteína, que se denomina LOR-1 (SEC ID N° 2) en el presente documento pertenece a la familia de enzimas de las lisil oxidasas, que catalizan la formación de enlaces covalentes entre residuos de lisina sobre colágeno adyacente o fibrillas de elastina. La familia de las lisil oxidasas incluye cuatro genes (27, 28, 32, 33), cuyas secuencias proteicas se presentan en las SEC ID N° 3, 6, 8 y 9. En la Figura 8 se presenta una comparación de homologías entre varios miembros de la familia de las lisil oxidasas, que se describe adicionalmente en la sección Ejemplos más adelante.

Cada miembro de la familia de enzimas de las lisil oxidasas incluye un dominio de lisil-oxidasa altamente conservado cuya actividad depende considerablemente de la presencia de cobre.

Cabe destacar que en estudios de la técnica anterior se ha demostrado que la retirada de cobre de los tejidos tumorales conduce a la inhibición de la angiogénesis (30, 34). Esto además corrobora el papel de la familia de enzimas de las lisil oxidasas en la angiogénesis, ya que, posiblemente, la eliminación del cobre conduce a la inhibición de las lisil oxidasas.

Los ensayos de unión de PF4-LOR-1 presentados en el presente documento proporcionan respaldo adicional de la actividad angiogénica. Como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, el PF4 es un inhibidor de la angiogénesis. Como tal, la actividad antiangiogénica exhibida por PF4 puede efectuarse a través de la inhibición de LOR-1, que, como se demuestra en la sección Ejemplos más adelante, se expresa considerablemente en las células endoteliales que revisten los vasos sanguíneos.

Por tanto, se proporciona un procedimiento de modular la angiogénesis.

El procedimiento se efectúa administrando en el tejido de mamífero una molécula capaz de modificar un nivel tisular y/o la actividad de al menos un tipo de lisil oxidasa para modular de este modo la angiogénesis en el tejido de mamíferos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "nivel tisular" se refiere al nivel de proteína lisil oxidasa presente en forma activa en el tejido en un punto de tiempo dado. Los niveles de proteína vienen determinados por factores tales como, las tasas de transcripción y/o traducción, el tiempo de recambio del ARN o la proteína y/o la localización de la proteína dentro de la célula. Como tal, cualquier molécula que efectúe cualquiera de estos factores puede modificar el nivel tisular a la lisil oxidasa.

Como se usa en el presente documento, el término "actividad" se refiere a una actividad enzimática de la lisil oxidasa. Una molécula que puede modificar la actividad enzimática puede alterar, directa o indirectamente, la

especificidad del sustrato de la enzima o la actividad del sitio catalítico de la misma.

Existen numerosos ejemplos de moléculas que puede modificar específicamente el nivel tisular y/o la actividad de una lisil oxidasa. Dichas moléculas se pueden clasificar en “reguladores por aumento” o “reguladores por disminución” de la lisil oxidasa.

#### 5 **Reguladores por disminución**

Un anticuerpo (policlonal, monoclonal o monoespecífico) o una porción de anticuerpo (p. ej., fragmento Fab) dirigida a al menos una porción de una lisil oxidasa (p. ej., región que abarca el sitio catalítico) se puede usar para inhibir específicamente la actividad lisil oxidasa cuando se introduce en el tejido de mamífero, como tal, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo dirigido a una lisil oxidasa se puede usar para suprimir o detener la formación de vasos sanguíneos.

En la técnica se conocen numerosos ejemplos de inhibidores de anticuerpos, incluidos inhibidores de la angiogénesis dirigidos a los factores angiogénico (14, 15).

Como se describe más adelante, se puede usar varios abordajes antisentido o de ribozimas para reducir o anular la transcripción o la traducción de una lisil oxidasa.

15 Una molécula antisentido que se puede usar con la presente invención incluye un polinucleótido o un análogo de polinucleótido de al menos 10 bases, preferentemente entre 10 y 15, más preferentemente entre 50 y 20 bases, lo más preferentemente al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 22, al menos 25, al menos 30 o al menos 40 bases, que puede hibridar in vivo, en condiciones fisiológicas, con una porción de una hebra polinucleotídica que codifica un polipéptido con una homología de al menos 50 % con las SEC ID N° 1, 4, 5 o 7 o con  
20 una homología de al menos 75 % con una porción en el extremo N del mismo según se determine usando el software BestFit del paquete para el análisis de la secuencia Wisconsin, usando el algoritmo de Smith y Waterman, en que la penalización por creación de hueco es igual a 8 y la penalización por extensión de hueco es igual a 2.

Los oligonucleótidos antisentido usados en le presente invención se pueden expresar a partir de una construcción de ácido nucleico administrada en el tejido, en cuyo caso preferentemente se usan promotores inducibles de modo que  
25 la expresión de antisentido se pueda encender o apagar o, como alternativa, dichos oligonucleótidos se pueden sintetizar químicamente y administrar directamente en el tejido, como parte de, por ejemplo, una composición farmacéutica.

La capacidad de sintetizar químicamente oligonucleótidos y análogos de los mismos que tienen una secuencia predeterminada seleccionada ofrece medios para modular por disminución la expresión génica. Se pueden  
30 considerar tres tipos de estrategias de modulación de la expresión génica.

A nivel de transcripción, los oligonucleótidos antisentido o sentido o análogos que se unen al ADN genómico mediante desplazamiento de hebra o la formación de una triple hélice pueden impedir la transcripción. A nivel del transcrito, los oligonucleótidos antisentido o análogos que se unen a las moléculas de ARN diana conducen a la  
35 escisión enzimática del híbrido mediante la RNasa H intracelular. En este caso, hibridando con el ARN objetivo, los oligonucleótidos o análogos oligonucleotídicos proporcionan un híbrido dúplex reconocido y destruido por la enzima RNasa H. Como alternativa, dicha formación de híbridos puede conducir a interferencias con el corte y empalme correcto. Como resultado, en ambos casos, el número de transcritos intactos del ARNm diana listos para traducir se reduce o elimina. A nivel de traducción, los oligonucleótidos antisentido o análogos que se unen a las moléculas de ARNm diana impiden, mediante hidrancia estérica, uniendo los factores de traducción esenciales (ribosomas) al  
40 ARNm diana, un fenómeno conocido en la técnica como cese de la hibridación, lo que inactiva la traducción de dichos ARNm.

En varios estudios de la técnica se ha demostrado que los oligonucleótidos antisentido pueden ser eficaces in vivo. Por ejemplo, se han usado moléculas antisentido para detener la proliferación de células hematopoyéticas (58), el crecimiento (59) o la entrada en la fase S del ciclo celular (60) y para impedir las respuestas medidas por receptor  
45 (61).

Se deben tener en cuenta varias consideraciones al diseñar los oligonucleótidos antisentido. Para una inhibición eficiente in vivo de la expresión génica usando oligonucleótidos antisentido o análogos, los oligonucleótidos o análogos deben cumplir los siguientes requisitos (i) suficiente especificidad en la unión a la secuencia diana; (ii) solubilidad en agua; (iii) estabilidad contra las nucleasas intra y extracelulares; (iv) capacidad de penetración a  
50 través de la membrana celular y (v) cuando se usa para tratar un organismo, toxicidad baja.

Los oligonucleótidos no modificados son, normalmente, poco prácticos para usar como secuencias antisentido, ya que tienen semividas cortas in vivo durante las cuales se degradan rápidamente por acción de las nucleasas. Además, son difíciles de preparar en cantidades superiores a miligramos. Adicionalmente, dichos oligonucleótidos atraviesan mal la membrana celular.

55 Por tanto, es evidente que, con el fin de cumplir todos los requisitos indicados anteriormente, los análogos

nucleotídicos tienen que concebirse de un modo adecuado.

Por ejemplo, los problemas que surgen en relación con el reconocimiento del ADN bicatenario (ADNs) a través de la formación de la triple hélice se han disminuido mediante una inteligente unión química de “retrodesplazamiento”, de modo que una secuencia de polipurina en una hebra se reconoce y, mediante “retrodesplazamiento” se puede reconocer una secuencia de homopurina en la otra hebra. Asimismo, se ha obtenido una buena formación de hélice usando bases artificiales, de modo que se mejoran las condiciones de unión con respecto a la fuerza iónica y el pH.

Además, con el fin de mejorar la semivida así como una penetración de la membrana se han realizado un gran número de variaciones en las estructuras polinucleotídicas, aunque con poco éxito.

Los oligonucleótidos se pueden modificar en la base, el azúcar o el resto fosfato. Estas modificaciones incluyen, por ejemplo, el uso de metilfosfonatos, monotiofosfonatos, ditiiofosfonatos, fosforoamidatos, ésteres fosfato, fosforotioatos con puente, fosforoamidatos con puente, metilfosfonatos con puente, análogos defosfointernucleotídicos con puentes de siloxano, puentes de carbonato, puentes de éster de carboximetilo, puentes de carbonato, puentes de éster de carboximetilo, puentes de acetamida, puentes de carbamato, puentes de tioéter, puentes sulfoxi, puentes sulfona, varios ADN de “plástico”, puentes anoméricos y derivados de borano (62).

La solicitud de patente internacional WO 89/12060 divulga varios bloques estructurales para sintetizar análogos oligonucleotídicos, así como análogos oligonucleotídicos formados uniendo dichos bloques estructurales en una secuencia definida. Los bloques estructurales pueden ser “rígidos” (es decir, que contienen una estructura en anillo) o “flexibles” (es decir, carecen de una estructura en anillo). En ambos casos, los bloques estructurales contienen un grupo hidroxilo y un grupo mercapto, a través de los cuales se dice que los bloques estructurales se unen para formar análogos oligonucleotídicos. El resto de unión en los análogos oligonucleotídicos se selecciona del grupo constituido por sulfuro (-S), sulfoxido (-SO-) y sulfato (-SO<sub>2</sub>-).

La solicitud de patente internacional WO 92/20702 describe un oligonucleótido acíclico que incluye una estructura peptídica sobre la cual cualquier nucleobase o análogo químicos seleccionados toma forma de cuerdas y sirven como caracteres de codificación como lo son en el ADN o ARN natural. Estos nuevos compuestos, conocidos como ácidos nucleicos peptídicos (PNA) no solo son más estables en las células que sus homólogos naturales sino que también se unen a ADN y ARN natural de 50 a 100 veces más fuertemente que los ácidos nucleicos adheridos. Los oligómeros de PNA se pueden sintetizar a partir de cuatro monómeros protegidos que contienen timina, citosina, adenina y guanina mediante síntesis peptídica de Merrifield en fase sólida. Con el fin de incrementar la solubilidad en agua y de impedir la agregación se introduce un grupo lisina amida en la región C-terminal.

Por tanto, la tecnología antisentido requiere apareamiento del ARN mensajero con un oligonucleótido para formar una doble hélice que inhibe la traducción. El concepto de la terapia génica mediada por antisentido ya se introdujo en 1978 para la terapia del cáncer. Este enfoque se basó en ciertos genes que son cruciales en la división y crecimiento celular de las células de cáncer. Los fragmentos sintéticos de ADN de la sustancia genética pueden alcanzar este objetivo. Dichas moléculas se unen a las moléculas del gen diana en el ARN de las células tumorales, de modo que se inhibe la traducción de los genes y se obtiene un crecimiento disfuncional de estas células. También se han propuesto otros mecanismos. Estas estrategias se han usado con algún éxito en el tratamiento de cánceres, así como de otras enfermedades, incluidas enfermedades víricas y otras enfermedades infecciosas.

Normalmente, los oligonucleótidos antisentido se sintetizan en longitudes de 13-30 nucleótidos. La vida de las moléculas oligonucleotídicas en sangre es bastante corta. Por tanto, tienen que modificarse químicamente para impedir la destrucción mediante nucleadas ubicuas presentes en el cuerpo. Los fosforotioatos son una modificación muy usada en los ensayos clínicos en curso con oligonucleótidos antisentido. Una nueva generación de moléculas antisentido consiste en oligonucleótidos antisentido híbridos con una porción central de ADN sintético mientras que cuatro bases en cada extremo se han modificado con 2'-O-metilribosa para simular el ARN. En estudios preclínicos en animales de laboratorio, dichos compuestos han demostrado mayor estabilidad al metabolismo en los tejidos corporales y un mejor perfil de seguridad en comparación con los fosforotioatos no modificados de primera generación. También se han analizado docenas de análogos nucleotídicos en la tecnología antisentido.

Los oligonucleótidos de ARN también se pueden usar para inhibición antisentido, ya que forman un dúplex de ARN-ARN estable con la diana, lo que sugiere una inhibición eficiente. No obstante, debido a su baja estabilidad, los oligonucleótidos de ARN normalmente se expresan dentro de las células usando vectores diseñados a este fin. Este enfoque se ve favorecido cuando se intenta apuntar a un ARNm que codifica una proteína abundante y duradera.

Los oligonucleótidos de ARN también se pueden diseñar para activar los mecanismos de interferencia de ARN dentro de la célula (ARNi). Los oligonucleótidos adecuados para este fin deben tener una longitud y un área de complementación definidas (63).

En publicaciones científicas recientes se ha validado la eficacia de los compuestos antisentido en modelos animales de hepatitis, cánceres, restenosis de las arterias coronarias y otras enfermedades. Recientemente la FDA ha aprobado el primer fármaco antisentido. El fármaco, Fomivirsén, desarrollado por Isis, está indicado para el tratamiento local del citomegalovirus en pacientes con SIDA que son intolerantes o tienen una contraindicación a otros tratamientos para la retinitis por CMV o que habían respondido de forma insuficiente a tratamientos previos

para la retinitis por CMV (Pharmacotherapy News Network).

Actualmente hay varios compuestos antisentido en ensayos clínicos en EE.UU. Estos incluyen antivirales administrados localmente, terapéuticas sistémicas para el cáncer. Las terapéuticas antisentido tienen el potencial de tratar muchas enfermedades potencialmente mortales con una serie de ventajas sobre los fármacos tradicionales.

5 Los fármacos tradicionales intervienen después de que se forme una proteína causante de la enfermedad. No obstante, las terapéuticas antisentido bloquean la transcripción/traducción del ARNm e intervienen antes de que se forme una proteína y, ya que las terapéuticas antisentido están dirigidas a un ARNm específico, deberían ser más eficaces con menos efectos secundarios que la terapia actual inhibidora de proteínas.

10 Una segunda opción para alterar la expresión génica a nivel de la transcripción usa oligonucleótidos sintéticos capaces de hibridar con el ADN bicatenario. Se forma una triple hélice. Dichos oligonucleótidos pueden impedir la unión de los factores de transcripción al promotor del gen y, por tanto, inhibir la transcripción. Como alternativa, pueden impedir el desenrollamiento del dúplex y, por tanto, la transcripción de los genes dentro de la estructura de la triple hélice.

15 Las ribozimas también se pueden usar como reguladores por disminución. Las ribozimas se usan cada vez más para la inhibición específica de secuencia de la expresión génica mediante la escisión de los ARNm que codifican las proteínas de interés. La posibilidad de diseñar ribozimas para escindir cualquier ARN diana específico las ha convertido en herramientas valiosas en aplicaciones de investigación básica y terapéuticas. En el área terapéutica se han explotado las ribozimas para dirigirse a ARN virales en enfermedades infecciosas, oncogenes dominantes en cánceres y mutaciones somáticas específicas en trastornos genéticos. De un modo más importante, varios protocolos para terapia génica con ribozimas para pacientes de VIH ya están en los ensayos de Fase 1 (67). Más recientemente se han usado ribozimas para investigación con animales transgénicos, validación de dianas génicas y descubrimiento de vías. Varias ribozimas están en diversas etapas de ensayos clínicos. ANGIOZYME fue la primera ribozima sintetizada químicamente en estudiarse en ensayos clínicos con humanos. ANGIOZYME inhibe específicamente la formación del VEGF-r (receptor del factor de crecimiento endotelial vascular), un componente clave en la vía de la angiogénesis. Ribozyme Pharmaceuticals, Inc., así como otras empresas, han demostrado la importancia de las terapéuticas antiangiogénesis en modelos animales. HEPTAZYME, una ribozima diseñada para destruir de forma selectiva el ARN del virus de la hepatitis C (VHC), se encontró eficaz en la disminución del ARN viral de la hepatitis C en ensayos de cultivo celular (Ribozyme Pharmaceuticals, Incorporated).

20 25 30 Los reguladores por disminución descritos en el presente documento anteriormente serían particularmente útiles para inhibir la angiogénesis en tejido tumoral. Se ha demostrado que el PF4, una proteína de unión de la lisil oxidasa que inhibe la angiogénesis en tejido tumoral se acumula específicamente en vasos sanguíneos tumorales recién formados (vasos angiogénicos), pero no en vasos sanguíneos establecidos (31, 35).

35 40 Los vasos sanguíneos angiogénicos recién formados son más permeables a las proteínas que los vasos sanguíneos establecidos porque el principal inductor de la angiogénesis en muchas enfermedades angiogénicas es VEGF, un factor de crecimiento que también funciona como un potente factor de permeabilización de vasos sanguíneos (VPF) (13). Por tanto, los vasos sanguíneos asociados con tumores están en un estado permanente de hiperpermeabilidad debido a la alteración de la regulación de la sobreexpresión de VEGF (36,37) y, como tal, una molécula reguladora por disminución usada mediante el procedimiento de la presente invención sería capaz de extravasarse de forma eficiente de los vasos sanguíneos tumorales pero con mucha menos eficiencia de los vasos sanguíneos estabilizados normales.

Con el fin de modular la angiogénesis, las moléculas reguladoras por disminución usadas en la presente invención se pueden administrar al individuo *per se* o en una composición farmacéutica, en la que se mezclan con vehículos o excipientes adecuados.

45 Como se usa en el presente documento, una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los ingredientes activos descritos en el presente documento con otros componentes químicos, tales como vehículos y excipientes fisiológicamente adecuados. La finalidad de una composición farmacéutica es facilitar la administración/dirigir de un compuesto a un mamífero.

50 Como se usa en el presente documento, la expresión "ingredientes activos" se refiere a la preparación responsable del efecto biológico, es decir las moléculas reguladoras por aumento/reguladoras por disminución usadas por la presente invención.

55 En lo sucesivo en el presente documento, las expresiones "vehículo fisiológicamente aceptable" y "vehículo farmacéuticamente aceptable" se usan de forma intercambiable para hacer referencia a un vehículo, tal como, por ejemplo, un liposoma, un virus, una micela o una proteína o un diluyente que no produzca irritación significativa en el mamífero y no anule la actividad biológica y las propiedades del ingrediente activo. En estas expresiones se incluye un adyuvante.

En el presente documento, el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un ingrediente activo. Ejemplos, sin limitaciones, de excipientes incluyen carbonato cálcico, fosfato cálcico, varios azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa,

gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

Las técnicas de formulación y administración de composiciones se pueden encontrar en la última edición de Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA, que se incorpora en el presente documento por referencia.

- 5 Las vías de administración adecuadas pueden incluir, por ejemplo, administración oral, rectal, transmucosa, transnasal, intestinal o parenteral, incluidas inyecciones intramusculares, subcutáneas e intramedulares, así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares.

10 Para inyección, los ingredientes activos de la invención se pueden formular en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hank, solución de Ringer o solución salina tamponada fisiológicamente. Para la administración transmucosa, en la formulación se usan agentes de penetración adecuados para atravesar la barrera. Tales agentes de penetración se conocen generalmente en la técnica.

15 Para administración oral, los compuestos se pueden formular fácilmente combinando el ingrediente activo con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Dichos vehículos permiten formular el ingrediente activo de la invención como comprimidos, píldoras, pastillas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones y similares, para ingestión oral por un paciente. Las preparaciones farmacológicas para uso oral se pueden fabricar usando un excipiente sólido, opcionalmente moliendo una mezcla resultante y procesando la mezcla de granulos, tras añadir las sustancias auxiliares adecuadas, si se desea, para obtener núcleos de comprimidos o núcleos de grageas. Excipientes adecuados son, en concreto, cargas, tales como azúcares, incluidas lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa, tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, 20 almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polímeros fisiológicamente aceptables tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes, tales como la polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido algínico o una sal de los mismos, tal como alginato de sodio.

25 Los núcleos de pastillas se proporcionan con recubrimientos adecuados. Para este fin, se pueden usar soluciones de azúcar concentradas, que opcionalmente pueden contener goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los recubrimientos de comprimidos o grageas para identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis del compuesto activo.

30 Las composiciones farmacéuticas que se pueden usar por vía oral incluyen cápsulas duras fabricadas de gelatina, así como cápsulas blandas selladas fabricadas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener ingredientes activos mezclados con una carga, tales como lactosa, aglutinantes tales como almidones, lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio, y, opcionalmente, estabilizantes. En cápsulas blandas, los ingredientes activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizantes. Todas las 35 formulaciones para administración oral deberán estar en dosis adecuadas para la vía de administración específica.

Para la administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas formulados de forma convencional.

40 Las preparaciones descritas en el presente documento se pueden formular para administración parenteral, por ejemplo mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en monodosis en, por ejemplo, ampollas o en envases multidosis con, opcionalmente, un conservante añadido. Las composiciones pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

45 Composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación activa en forma hidrosoluble. Adicionalmente se pueden preparar suspensiones de los ingredientes activos como suspensiones oleosas o a base de agua para inyección adecuadas. Disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo, triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones inyectables acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol, o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados para aumentar la solubilidad de los 50 ingredientes activos y permitir la preparación de soluciones muy concentradas.

Como alternativa, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para reconstituir con un vehículo adecuado, por ejemplo una solución a base de agua apirógena estéril, antes de usar.

55 La preparación de la invención también se puede formular en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, usando, por ejemplo, bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Composiciones farmacéuticas adecuadas para usar en el contexto de la presente invención incluyen composiciones

en las que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para alcanzar el propósito previsto.

La composición farmacéutica puede formar una parte de un artículo de fabricación, que también incluye un material de envasado para contener la composición farmacéutica y un folleto que proporciona indicaciones de uso para la composición farmacéutica,

- 5 Por tanto, la presente divulgación proporciona un procedimiento y composiciones farmacéuticas útiles para modular la angiogénesis.

Dicha actividad de modulación se puede usar para tratar la artritis (38,39), la retinopatía diabética (40), la psoriasis (41,42) y la vasculitis (43,44).

- 10 Como tal, la administración de secuencias que codifican lisil oxidasas o de polipéptidos se puede usar para corregir algunas de las manifestaciones de estas enfermedades.

Además, las evidencias presentadas en la sección Ejemplos que indican que LOR-1 puede expresarse más en las líneas celulares metastásicas que en las líneas celulares no metastásicas (Figura 3), sugieren que se pueden usar niveles de expresión de LOR-1 como herramienta diagnóstica para determinar la malignidad de las células cancerosas y, por tanto, para determinar qué régimen de tratamiento debería usarse.

- 15 Otros objetos, ventajas y características nuevas de la presente invención serán obvias para los expertos en la técnica a partir del análisis de los ejemplos siguientes que no se pretende que sean limitantes. Adicionalmente, cada una de las diversas realizaciones y aspectos de la presente invención que se han indicado anteriormente en el presente documento y según se reivindica en la sección Reivindicaciones más adelante encuentra respaldo experimental en los ejemplos siguientes.

## 20 Ejemplos

A continuación se hace referencia a los ejemplos siguientes, que, junto con las descripciones anteriores, ilustran la invención de un modo no limitante.

- En general, la nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio usados en la presente invención incluyen técnicas de ADN moleculares, bioquímicos, microbiológicos y recombinantes. Dichas técnicas se explican exhaustivamente en la literatura. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook y col., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel y col., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson y col., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren y col. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); metodologías como se indican en las patentes de EE.UU. n° 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites y col. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª Edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman y Co., New York (1980); los inmunoensayos disponibles se describen extensamente en la patente y la literatura científica, véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak y col., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); todos los cuales se incorporan por referencia y se indican completamente en el presente documento. Otras referencias generales se proporcionan a lo largo del presente documento. Se cree que los procedimientos en el mismo son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para comodidad del lector.

### Ejemplo 1

#### *El papel de LOR1 en la angiogénesis*

Se realizó un estudio en un esfuerzo para confirmar y caracterizar adicionalmente el papel de la LOR-1 en la angiogénesis.

## 50 Materiales y procedimientos

El factor 4 de plaquetas recombinante humano (PF4, Número de Acceso en GenBank M20901) producido en bacterias y mezclado de nuevo fue suministrado por el Dr. Maione of Repligen Corp. (Boston, EE.UU.). Las pastillas de liberación lenta de estrógenos se obtuvieron en Innovative Research of America, Sarasota, FL, EE.UU.

**Construcción del vector de expresión de LOR-1, transfección en células MCF7 y expresión:** El ADNc de LOR-1 (SEC ID N° 1) se clonó en un vector de expresión pCDNA3.1-hygro (Invitrogen Inc., EE.UU.) bajo el control de un promotor de CMV. Los clones de las células que expresan LOR-1 se seleccionaron usando higromicina y se analizó la expresión de LOR-1 usando el antisuero policlonal descrito más adelante.

**Construcción de las columnas de afinidad para el factor 4 de plaquetas y purificación de LOR-1 en dichas columnas:** El PF4 se acopló a sefarosa usando una modificación del procedimiento de Miron y Wilchek (51) como se ha descrito previamente para el factor de crecimiento endotelial vascular (52). Se recogió medio acondicionado sin suero de células MCF-7 marcadas con <sup>35</sup>S-metionina que sobreexpresa LOR-1. El medio acondicionado se pasó por la columna dos veces. La columna se lavó con solución salina tamponada con fosfato (NaCl 300 mM, pH-7,2) y se eluyó con PBS (que contiene NaCl 2M).

**Experimentos con ratones atímicos:** Células MCF-7 modificadas o parentales (10<sup>7</sup> células por animal) se implantaron bajo la piel de ratones atímicos. Se implantó una pastilla de liberación lenta de estrógenos a 1 cm de lo descrito anteriormente (53). Los tumores se midieron periódicamente tras lo cual se extrajeron los tumores de al menos 1 cm de tamaño y se analizaron inmunohistológicamente usando un anticuerpo comercial dirigido contra un antígeno de tipo factor 8 que sirvió como marcador específico para las células endoteliales.

**Hibridación in situ:** Los fragmentos que abarcan los nucleótidos 922-1564 de LOR-1, los nucleótidos 976-1391 de LOL, los nucleótidos 400-950 de LO y los nucleótidos 1061-1590 de LOR-2 (numerados desde el codón ATG de estas secuencias) se subclonaron cada uno de forma independiente en los vectores Bluescript SK y KS (Stratagene). Se usó un kit de marcaje de ARNc DIG de Boehringer-Mannheim para transcribir las sondas de ARNc sentido (s) y antisentido (as) marcadas con digoxigenina del promotor de T7 de las construcciones Bluescript. La hibridación y la posterior detección de las sondas hibridadas se llevó a cabo esencialmente como se ha descrito anteriormente (54).

**Antisueros policlonales anti-LOR-1:** Los antisueros generados inyectando un péptido recombinante que contiene los 200 aminoácidos del extremo C de LOR-1 (aminoácidos 540-744 de la SEC ID N° 2) en conejos hembra. El suero se recogió 10 días después de cada inyección y una fracción de inmunoglobulina se purificó usando una columna de afinidad de sefarosa proteína A (Pharmacia).

## Resultados

**Purificación de LOR-1:** Se usó una columna de afinidad de PF4 para detectar proteínas de células endoteliales que interaccionen específicamente con PF4.

Se detectaron dos proteínas de unión a PF4 en medio acondicionado de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), mientras que no se detectaron proteínas de unión a PF4 en extractos de detergente de células endoteliales.

Dos litros de medio acondicionado permitieron una purificación parcial de una de estas proteínas de unión que eluyó de la columna a concentraciones de sales relativamente altas (NaCl 0,4 - 0,5 M).

Se realizó orificación adicional de esta proteína usando cromatografía de líquidos de alta presión de fase inversa y cromatografía en SDS/PAGE. La proteína de unión a PF4 no se unió a heparina ni era un proteoglicano de heparán-sulfato ya que la digestión con heparinasa no pudo cambiar su movilidad en los experimentos de SDS/PAGE.

La secuenciación parcial y la comparación de bases de datos revelaron que la proteína de unión a PF4 de la presente invención (LOR-1) pertenece a una familia de proteínas que contienen un dominio similar a la lisil oxidasa (28,29). Las lisil oxidasas son enzimas dependientes de cobre que participan en la síntesis de la matriz extracelular catalizando la formación de enlaces covalentes entre lisinas de fibras de colágeno o de elastina adyacentes.

La secuencia de aminoácidos de longitud completa de LOR-1 (deducida a partir de la secuencia de ADNc aislado) mostró un alto grado de identidad con WS9-14, una proteína sobreexpresada en fibroblastos senescentes, e varios tipos de células adherentes (pero o en las células no adherentes) y en fibroblastos, en los que se correlacionó con los niveles de expresión de pro-colágeno I- $\alpha$ 1, además de ser inducida por el TGF- $\beta$  e inhibida por ésteres de forbol y ácido retinoico (27).

**Papel de LOR-1 en el desarrollo del tumor:** La LOR-1 recombinante se expresó en células PAE unidas específicamente con la columna de afinidad de PF4 (Figura 1). Dado que LOR-1 es un miembro de la familia de LO, se postuló la hipótesis de que participa e la formación de MEC durante la angiogénesis. Además, también se postuló la hipótesis de que el PF4 suprime o inhibe la actividad proangiogénica de LOR-1, de modo que inhibe las etapas posteriores de la formación de vasos sanguíneos y, como resultado, limita el crecimiento del tumor.

**Expresión de LOR-1:** La hibridación in situ demostró que LOR-1 se expresa en una amplia variedad de tejidos y tipos celulares, incluidos fibroblastos, adipocitos, células nerviosas, células endoteliales y varias células epiteliales. Varios tipos de células, tales como los hepatocitos hepáticos, no expresaron LOR-1; de los 4 miembros de la familia LO analizados (todos excepto para LoxC), LOR-1 fue la única que se expresó en células endoteliales de los vasos sanguíneos.

**LOR-1 y cáncer:** Como se muestra en la Figura 2, en el presente documento se demostró una correlación directa entre los niveles de expresión de LOR-1 y las propiedades metastásicas de las líneas celulares derivadas de cáncer de mama.

5 Dado que las células epiteliales que revisten los conductos galactóforos del tejido de mama normal (de los que surgen la mayoría de los tumores de mama) expresan grandes cantidades de LOR-1, es posible que las líneas menos metastásicas perdieran expresión de LOR-1 en lugar de ganarla.

Para corroborar su papel en la metástasis, el ADNc de LOR-1 se expresó en líneas celulares MCF-7 derivadas de cáncer de mama no metastásico que normalmente no expresan LOR-1. La expresión de LOR-1 se analizó usando anticuerpos policlonales de conejo generados como se ha descrito anteriormente (Figura 3).

10 Una línea celular control que se transfeccionó con un vector de expresión vacío y una línea celular MCF-7 que expresa LOR-1 se implantaron bajo la piel de ratones con deficiencias inmunitarias junto con una pastilla de liberación lenta de estrógenos, como se ha descrito anteriormente. Los estrógenos se añadieron porque el desarrollo de tumores a partir de esta línea celular no metastásica depende de estrógenos (55).

15 La velocidad de desarrollo del tumor en ratones se monitorizó de forma continua (Figura 4); los tumores de 1 cm de tamaño se extirparon y se sometieron a análisis histológico como se ha descrito anteriormente. Es interesante el hecho de que la velocidad del desarrollo tumoral variaba entre las dos líneas celulares, en las que algunos tumores exhibieron un crecimiento más lento en MCF-7 que expresan LOR-1 y otros exhiben un crecimiento más lento en las células control.

20 Con el fin de superar los problemas del nivel de expresión, el ADNc de LOR-1 se introdujo bajo el control de un promotor inducido por tetraciclina (el sistema TET-off). Dicha construcción permitirá determinar de forma concluyente su la menor velocidad de crecimiento tumoral observada en las células que expresan LOR esta de hecho causada por LOR-1.

25 Los tumores que expresan cantidades grandes de LOR-1 se cortaron y se tiñeron con un anticuerpo dirigido contra el antígeno similar al factor 8, un marcador específico de células endoteliales. El tejido tumoral control se tiñó predominantemente en la cápsula alrededor del tumor, mientras que en los tumores de expresión de LOR-1 se observó una pronunciada tinción en las regiones internas del tejido tumoral (Figura 5a y Figura 5b respectivamente).

30 **Papel de LOR-1 en la enfermedad de Gilson y en otras enfermedades hepáticas crónicas:** El tejido hepático normal y enfermo se sondó con sondas de LOR-1 sentido (Figuras 6a y 6c) y antisentido (Figuras 6b y 6d). Los tejidos hepáticos normales expresan niveles muy bajos de LOR-1 (Figura 6b). No obstante, los tejidos hepáticos fibróticos como los observados en la enfermedad de Wilson exhiben un fuerte incremento de la expresión de LOR-1 en hepatocitos (Figuras 6d).

**Expresión de LOR-1 en embriones de pollo:** La Figura 7 ilustra expresión de LOR-1 de ARNm de LOR-1 en vasos sanguíneos de un embrión de pollo en desarrollo. La hibridación in situ de toda la cantidad de embriones de pollo de 4 días de edad reveló expresión de ARNm de LOR-1 en vasos sanguíneos localizados en el amnios (flecha).

35 **La familia de las lisil oxidasas:** Una comparación de la homología entre cinco miembros de la familia de las lisil oxidasas, que incluye la subfamilia LO y LOL y la subfamilia LOR-1 y LOR-2 reveló una fuerte homología en la porción C-terminal, que incluye el motivo de la lisil oxidasa conservado. LOR-1 y LOR-1 se caracterizaron por tiras largas en N-terminal que no se encuentran en LO y LOL.

#### REFERENCIAS CITADAS

40 (Referencias adicionales se citan en el texto)

1. Folkman, J. (1990) What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent. J. Nat. Cancer Inst. 82, 4-7.
2. Hanahan, D. and Folkman, J. (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell 86, 353-364.
- 45 3. Boehm, T., Folkman, J., Browder, T., and O'Reilly, M. S. (1997) Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. Nature 390, 404-407.
4. Bergers, G., Javaherian, K., Lo, K. M., Folkman, J., and Hanahan, D. (1999) Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. Science 284, 808-812.
5. Zetter, B. R. (1998) Angiogenesis and tumor metastasis. Annu. Rev. Med. 49:407-424,407-424.
- 50 6. Weidner, N. (1998) Tumoural vascularity as a prognostic factor in cancer patients: The evidence continues to grow. J. Pathol. 184, 119-122.
7. Degani, H., Gasis, V., Weinstein, D., Fields, S., and Strano, S. (1997) Mapping pathophysiological features of breast tumors by MRI at high spatial resolution. Nature Med. 3, 780-782.
8. Guidi, A. J., Schnitt, S. J., Fischer, L., Tognazzi, K., Harris, J. R., Dvorak, H. F., and Brown, L. F. (1997) Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in patients with ductal carcinoma in situ of the breast. Cancer 80, 1945-1953.

9. Balsari, A., Maier, J. A. M., Colnaghi, M. I., and Menard, S. (1999) Correlation between tumor vascularity, vascular endothelial growth factor production by tumor cells, serum vascular endothelial growth factor levels, and serum angiogenic activity in patients with breast carcinoma. *Lab. Invest.* 79, 897-902.
- 5 10. Klauber, N., Parangi, S., Flynn, E., Hamel, E., and D'Amato, R. J. (1997) Inhibition of angiogenesis and breast cancer in mice by the microtubule inhibitors 2-methoxyestradiol and taxol. *Cancer Res.* 57, 81-86.
11. Harris, A. L., Zhang, H. T., Moghaddam, A., Fox, S., Scott, P., Pattison, A., Gatter, K., Stratford, I., and Bicknell, R. (1996) Breast cancer angiogenesis - New approaches to therapy via antiangiogenesis, hypoxic activated drugs, and vascular targeting. *Breast Cancer Res. Treat.* 38, 97-108.
- 10 12. Weinstatsaslow, D. L., Zabrenetzky, V. S., Vanhoutte, K., Frazier, W. A., Roberts, D. D., and Steeg, P. S. (1994) Transfection of thrombospondin 1 complementary DNA into a human breast carcinoma cell line reduces primary tumor growth, metastatic potential, and angiogenesis. *Cancer Res.* 54, 6504-6511.
13. Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., and Poltorak, Z. (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* 13, 9-22.
- 15 14. Brooks, P. C., Montgomery, A. M. P., Rosenfeld, M., Reisfeld, R. A., Hu, T. H., Klier, G., and Cheresch, D. A. (1994) Integrin alpha(v)beta(3) antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 79, 1157-1164.
15. Brooks, P. C., Silletti, S., Von Schalscha, T. L., Friedlander, M., and Cheresch, D. A. (1998) Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity. *Cell* 92, 391-400.
- 20 16. O'Reilly, M. S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W. S., Flynn, E., Birkhead, J. R., Olsen, B. R., and Folkman, J. (1997) Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88, 277-285.
17. O'Reilly, M. S., Holmgren, L., Chen, C., and Folkman, J. (1996) Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nature Med.* 2, 689-692.
- 25 18. Tanaka, T., Manome, Y., Wen, P., Kufe, D. W., and Fine, H. A. (1997) Viral vector-mediated transduction of a modified platelet factor 4 cDNA inhibits angiogenesis and tumor growth. *Nature Med.* 3, 437-442.
19. Maione, T. E., Gray, G. S., Petro, J., Hunt, A. J., Donner, A. L., Bauer, S. I., Carson, H. F., and Sharpe, R. J. (1990) Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor-4 and related peptides. *Science* 247, 77-79.
- 30 20. Neufeld, G., Akiri, G., and Vadasz, Z. (2000) in *Platelet Factor 4 (PF4). The Cytokine Reference: A compendium of cytokines and other mediators of host defence* (Oppenheim, J. J. and Feldmann, M. eds) Academic Press.
21. Gengrinovitch, S., Greenberg, S. M., Cohen, T., Gitay-Goren, H., Rockwell, P., Maione, T. E., Levi, B., and Neufeld, G. (1995) Platelet factor-4 inhibits the mitogenic activity of VEGF-121 and VEGF-165 using several concurrent mechanisms. *J. Biol. Chem.* 270, 15059-15065.
- 35 22. Brown, K. J. and Parish, C. R. (1994) Histidine-rich glycoprotein and platelet factor 4 mask heparan sulfate proteoglycans recognized by acidic and basic fibroblast growth factor. *Biochemistry* 33, 13918-13927.
23. Gupta, S. K. and Singh, J. P. (1994) Inhibition of endothelial cell. Proliferation by platelet factor-4 involves a unique action on S phase progression. *J. Cell Biol.* 127, 1121-1127.
- 40 24. Watson, J. B., Getzler, S. B., and Mosher, D. F. (1994) Platelet factor 4 modulates the mitogenic activity of basic fibroblast growth factor. *J. Clin. Invest.* 94, 261-268.
25. Maione, T. E., Gray, G. S., Hunt, A. J., and Sharpe, R. J. (1991) Inhibition of tumor growth in mice by an analogue of platelet factor 4 that lacks affinity for heparin and retains potent angiostatic activity. *Cancer Res.* 51, 2077-2083.
- 45 26. Sharpe, R. J., Byers, H. R., Scott, C. F., Bauer, S. I., and Maione, T. E. (1990) Growth inhibition of murine melanoma and human colon carcinoma by recombinant human platelet factor 4. *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 848-853.
27. Saito, H., Papaconstantinou, J., Sato, H., and Goldstein, S. (1997) Regulation of a novel gene encoding a lysyl oxidase-related protein in cellular adhesion and senescence. *J. Biol. Chem.* 272, 8157-8160.
- 50 28. Kim, Y., Boyd, C. D., and Csiszar, K. (1995) A new gene with sequence and structural similarity to the gene encoding human lysyl oxidase. *J. Biol. Chem.* 270, 7176-7182.
29. Kim, Y. H., Peyrol, S., So, C. K., Boyd, C. D., and Csiszar, K. (1999) Coexpression of the lysyl oxidase-like gene (LOXL) and the gene encoding type III procollagen in induced liver fibrosis. *J. Cell Biochem.* 72, 181-188.
- 55 30. Rabinovitz, M. (1999) Angiogenesis and its inhibition: the copper connection. *J. Natl. Cancer Inst.* 91, 1689-1690.
31. Hansell, P., Maione, T. E., and Borgstrom, P. (1995) Selective binding of platelet factor 4 to regions of active angiogenesis in vivo. *Amer. J. Physiol-Heart. Circ. Phy.* 38, H829-H836.
- 60 32. Reiser, K., McCormick, R. J., and Rucker, R. B. (1992) Enzymatic and nonenzymatic cross-linking of collagen and elastin. *FASEB J.* 6, 2439-2449.
33. Jang, W., Hua, A., Spilson, S. V., Miller, W., Roe, B. A., and Meisler, M. H. (1999) Comparative sequence of human and mouse BAC clones from the mnd2 region of chromosome 2p13. *Genome Res.* 9, 53-61.
34. Yoshida, D., Ikeda, Y., and Nakazawa, S. (1995) Copper chelation inhibits tumor angiogenesis in the experimental 9L gliosarcoma model. *Neurosurgery* 37, 287-292.
- 65 35. Borgstroem, P., Discipio, R., and Maione, T. E. (1998) Recombinant platelet factor 4, an angiogenic marker for human breast carcinoma. *Anticancer Res.* 18, 4035-4041.

36. Shweiki, D., Neeman, M., Itin, A., and Keshet, E. (1995) Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: Implications for tumor angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 768-772.
- 5 37. Rak, J., Mitsuhashi, Y., Bayko, L., Filmus, J., Shirasawa, S., Sasazuki, T., and Kerbel, R. S. (1995) Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: Implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 55, 4575-4580,
38. Koch, A. E. (1998) Angiogenesis - Implications for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 41, 951-962.
39. Paleolog, E. M. and Fava, R. A. (1998) Angiogenesis in rheumatoid arthritis: implications for future therapeutic strategies. *Springer Semin. Immunopathol.* 20, 73-94.
- 10 40. Miller, J. W., Adamis, A. P., and Aiello, L. P. (1997) Vascular endothelial growth factor in ocular neovascularization and proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Metab. Rev.* 13, 37-50,
41. Detmar, M., Brown, L. F., Claffey, K. P., Yee, K. T., Kocher, O., Jackman, R. W., Berse, B., and Dvorak, H. F. (1994) Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis. *J. Exp. Med.* 180, 1141-1146.
- 15 42. Creamer, D., Allen, M. H., Sousa, A., Poston, R., and Barker, J. N. W. N. (1997) Localization of endothelial proliferation and microvascular expansion in active plaque psoriasis. *Br. J. Dermatol.* 136, 859-865.
43. Lie, J. T. (1992) Vasculitis simulators and vasculitis look-alikes. *Curr. Opin. Rheumatol.* 4,47-55.
44. Klipple, G. L. and Riordan, K. K. (1989) Rare inflammatory and hereditary connective tissue diseases. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 15, 383-398.
- 20 45. Brahn, E., Lehman, T. J. A., Peacock, D. J., Tang, C., and Banquerigo, M. L. (1999) Suppression of coronary vasculitis in a murine model of Kawasaki disease using an angiogenesis inhibitor. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 90, 147-151.
46. Cid, M. C., Grant, D. S., Hoffman, G. S., Auerbach, R., Fauci, A. S., and Kleinman, H. K. (1993) Identification of Haptoglobin as an Angiogenic Factor in Sera from Patients with Systemic Vasculitis. *J. Clin. Invest.* 91, 977-985.
- 25 47. Hoffman, G. S., Filie, J. D., Schumacher, H. R., Jr., Ortiz-Bravo, E., Tsokos, M. G., Marini, J. C., Kerr, G. S., Ling, Q. H., and Trentham, D. E. (1991) Intractable vasculitis, resorptive osteolysis, and immunity to type I collagen in type VIII Ehlers-Danlos syndrome. *Arthritis Rheum.* 34, 1466-1475.
48. Bauters, C. and Isner, J. M. (1997) The biology of restenosis. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 40, 107-116.
- 30 49. Begelman, S. M. and Olin, J. W. (2000) Fibromuscular dysplasia. *Curr. Opin. Rheumatol.* 12,41-47.
- 50, Palta, S., Pai, A. M., Gill, K. S., and Pai, R. G. (2000) New insights into the progression of aortic stenosis : implications for secondary prevention. *Circulation* 101, 2497-2502.
51. Wilchek, M. Miron, T., 1982. Immobilization of enzymes and affinity ligands onto agarose via stable and uncharged carbamate linkages. *Biochem. Int.* 4, 629-635.
- 35 52. Soker, S., Takashima, S., Miao, H. Q., Neufeld, G., Klagsbrun, M., 1998. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92, 735-745.
53. Zhang, H. T., Craft, P., Scott, P. A. E., Ziche, M., Weich, H. A., Harris, A. L., Bicknell, R., 1995. Enhancement of tumor growth and vascular density by transfection of vascular endothelial cell growth factor into MCF-7 human breast carcinoma cells. *J. Nat. Cancer Inst.* 87, 213-219.
- 40 54. Cohen, T., Gluzman-Poltorak, Z., Brodzky, A., Meytal, V., Sabo, E., Misselevich, I., Hassoun, M., Boss, J. H., Resnick, M., Shneyvas, D., Eldar, S., Neufeld, G., 2001. Neuroendocrine Cells along the Digestive Tract Express Neuropilin-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284, 395-403.
55. Mcleskey, S. W., Kurebayashi, J., Honig, S. F., Zwiebel, J., Lippman, M. E., Dickson, R. B., Kern, F. G., 1993. Fibroblast Growth Factor-4 Transfection of MCF-7 Cells Produces Cell Lines That Are Tumorigenic and Metastatic in Ovariectomized or Tamoxifen-Treated Athymic Nude Mice. *Cancer Res.* 53, 2168-2177.
56. Nakamura y col., *Cancer Res* 60(3), 760-5, 2000,
58. Szczylik y col., (1991) Selective inhibition of leukemia cell proliferation by BCR-ABL antisense oligodeoxynucleotides. *Science* 253:562.
- 50 59. Calabretta y col., (1991) Normal and leukemic hematopoietic cell manifest differential sensitivity to inhibitory effects of c-myc antisense oligodeoxynucleotides: an in vitro study relevant to bone marrow purging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2351.
- 60, Heikhila y col., (1987) A c-myc antisense oligodeoxynucleotide inhibits entry into S phase but not progress from G(0) to G(1). *Nature*, 328:445.
- 55 61. Burch y Mahan (1991) Oligodeoxynucleotides antisense to the interleukin I receptor m RNA block the effects of interleukin I in cultured murine and human fibroblasts and in mice. *J. Clin. Invest.* 88:1190,
62. Cook (1991) Medicinal chemistry of antisense oligonucleotides-future opportunities. *Anti-Cancer Drug Design* 6:585.
63. Carthew RW. Gene silencing by double-stranded RNA. *Curr Opin Cell Biol* 2001 Apr;13(2):244-8.
- 60 64. S. y Ikeda, J.E.: Trapping of mammalian promoters by Cre-lox site-specific recombination. *DNA Res* 3 (1996) 73-80,
65. Bedell, M.A., Jenkins, N.A. and Copeland, N.G.: Mouse models of human disease. Part I: Techniques and resources for genetic analysis in mice. *Genes and Development* 11 (1997) 1-11.
66. Bermingham, J.J., Scherer, S.S., O'Connell, S., Arroyo, E., Kalla, K.A., Powell, F.L. and Rosenfeld, M.G.: Tst-1/Oct-6/SCIP regulates a unique step in peripheral myelination and is required for normal respiration. *Genes Dev* 10 (1996) 1751-62.

67. Welch P.J., Barber J.R., and Wong-Staal F. (1998) Expression of ribozymes in gene transfer systems to modulate target RNA levels. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 9(5):486-496.

68. Bedell-Hogan,D., Trackman,P., Abrams,W., Rosenbloom,J., and Kagan,H. (1993) Oxidation, cross-linking, and insolubilization of recombinant tropoelastin by purified lysyl oxidase. *J. Biol. Chem.* 268, 10345-10350)

5 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Neufeld, Gera

Gengrinovitch, Stela

akiri , Gal

Vadaz, Zehava

10 <120> COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS Y PROCEDIMIENTOS ÚTILES PARA MODULAR LA ANGIOGÉNESIS

<130> 01/22064

<150> US 60/223,739

<151> 2000-08-08

15 <160> 9

<170> PatentIn versión 3.

<210> 1

<211> 2325

<212> ADN

20 <213> Homo sapiens

<400> 1

```

atggagaggc ctctgtgctc ccacctctgc agctgcctgg ctatgctggc cctcctgtcc      60
cccctgagcc tggcacagta tgacagctgg cccattacc ccgagtactt ccagcaaccg      120
gctcctgagt atcaccagcc ccaggcccc gccaacgtgg ccaagattca gctgcgcttg      180
gctgggcaga agaggaagca cagcgagggc cgggtggagg tgtactatga tggccagtgg      240
ggcaccgtgt gcgatgacga cttctccatc cacgctgccc acgtcgtctg ccgggagctg      300
ggctatgtgg aggccaagtc ctggactgcc agctcctcct acggcaaggg agaagggccc      360
atctggttag acaatctcca ctgtactggc aacgaggcga cccttgacag atgcacctcc      420
aatggctggg gcgtcactga ctgcaagcac acggaggatg tcggtgtggt gtgcagcgac      480
aaaaggattc ctgggttcaa atttgacaat tcggtgatca accagataga gaacctgaat      540

```

ES 2 387 329 T3

atccaggtgg aggacattcg gattcgagcc atcctctcaa cctaccgcaa gcgcacccc  
 gtgatggagg gctacgtgga ggtgaaggag ggcaagacct ggaagcagat ctgtgacaag 660  
 cactggacgg ccaagaattc ccgctgtgtc tgcggcatgt ttggcttccc tggggagagg 720  
 acatacaata ccaaagtgtg caaaatgttt gcctcacgga ggaagcagcg ctactggcca 780  
 ttctccatgg actgcaccgg cacagaggcc cacatctcca gctgcaagct gggccccag 840  
 gtgtcactgg accccatgaa gaatgtcacc tgcgagaatg ggctgccggc cgtgggtgagt 900  
 tgtgtgcctg ggcaggtctt cagccctgac ggaccctcga gattccggaa agcatacaag 960  
 ccagagcaac ccctggtgcg actgagaggc ggtgcctaca tcggggaggg ccgctgtggag 1020  
 gtgctcaaaa atggagaatg ggggaccgtc tgcgacgaca agtgggacct ggtgtcggcc 1080  
 agtgtggtct gcagagagct gggctttggg agtgccaaag aggcagtcac tggctcccga 1140  
 ctggggcaag ggatcggacc catccacctc aacgagatcc agtgcacagg caatgagaag 1200  
 tccattatag actgcaagtt caatgccgag tctcagggct gcaaccacga ggaggatgct 1260  
 ggtgtgagat gcaacacccc tgccatgggc ttgcagaaga agctgcgcct gaacggcggc 1320  
 cgcaatccct acgagggccg agtggaggtg ctggtggaga gaaacgggtc ccttgtgtgg 1380  
 gggatggtgt gtggcaaaa ctggggcatc gtggaggcca tgggtggtctg ccgccagctg 1440  
 ggctgggat tcgccagcaa gccttccag gagacctggt attggcacgg agatgtcaac 1500  
 agcaacaaag tggatcatgag tggagtgaag tgctcgggaa cggagctgtc cctggcgcac 1560  
 tgccgccacg acggggagga cgtggcctgc cccagggcg gagtgcagta cggggccgga 1620  
 gttgcctgct cagaaaccgc cctgacctg gtcctcaatg cggagatggt gcagcagacc 1680  
 acctacctgg aggaccggcc catgttcatg ctgcagtgtg ccatggagga gaactgcctc 1740  
 tcggcctcag ccgcgcagac cgacccccacc acgggctacc gccggctcct gcgcttctcc 1800  
 tcccagatcc acaacaatgg ccagtccgac ttccggccca agaacggccg ccacgcgtgg 1860  
 atctggcacg actgtcacag gactaccac agcatggagg tgttcacca ctatgacctg 1920  
 ctgaacctca atggcacaa ggtggcagag ggccacaagg ccagcttctg cttggaggac 1980  
 acagaatgtg aaggagacat ccagaagaat tacgagtgtg ccaacttcgg cgatcagggc 2040  
 atcaccatgg gctgctggga catgtaccgc catgacatcg actgccagtg ggttgacatc 2100  
 actgacgtgc cccctggaga ctacctgttc caggttggtt ttaaccccaa cttcgaggtt 2160  
 gcagaatccg attactcaa caacatcatg aaatgcagga gccgctatga cggccaccgc 2220  
 atctggatgt acaactgcca cataggtggt tccttcagcg aagagacgga aaaaaagttt 2280  
 gagcacttca gcgggctctt aaacaaccag ctgtccccgc agtaa 2325

<210> 2

<211> 774

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 387 329 T3

<400> 2

Met Glu Arg Pro Leu Cys Ser His Leu Cys Ser Cys Leu Ala Met Leu  
 1 5 10 15

Ala Leu Leu Ser Pro Leu Ser Leu Ala Gln Tyr Asp Ser Trp Pro His  
 20 25 30

Tyr Pro Glu Tyr Phe Gln Gln Pro Ala Pro Glu Tyr His Gln Pro Gln  
 35 40 45

Ala Pro Ala Asn Val Ala Lys Ile Gln Leu Arg Leu Ala Gly Gln Lys  
 50 55 60

Arg Lys His Ser Glu Gly Arg Val Glu Val Tyr Tyr Asp Gly Gln Trp  
 65 70 75 80

Gly Thr Val Cys Asp Asp Asp Phe Ser Ile His Ala Ala His Val Val  
 85 90 95

Cys Arg Glu Leu Gly Tyr Val Glu Ala Lys Ser Trp Thr Ala Ser Ser  
 100 105 110

Ser Tyr Gly Lys Gly Glu Gly Pro Ile Trp Leu Asp Asn Leu His Cys  
 115 120 125

Thr Gly Asn Glu Ala Thr Leu Ala Ala Cys Thr Ser Asn Gly Trp Gly  
 130 135 140

Val Thr Asp Cys Lys His Thr Glu Asp Val Gly Val Val Cys Ser Asp  
 145 150 155 160

Lys Arg Ile Pro Gly Phe Lys Phe Asp Asn Ser Leu Ile Asn Gln Ile  
 165 170 175

Glu Asn Leu Asn Ile Gln Val Glu Asp Ile Arg Ile Arg Ala Ile Leu  
 180 185 190

Ser Thr Tyr Arg Lys Arg Thr Pro Val Met Glu Gly Tyr Val Glu Val  
 195 200 205

Lys Glu Gly Lys Thr Trp Lys Gln Ile Cys Asp Lys His Trp Thr Ala  
 210 215 220

ES 2 387 329 T3

Lys Asn Ser Arg Val Val Cys Gly Met Phe Gly Phe Pro Gly Glu Arg  
 225 230 235 240

Thr Tyr Asn Thr Lys Val Tyr Lys Met Phe Ala Ser Arg Arg Lys Gln  
 245 250 255

Arg Tyr Trp Pro Phe Ser Met Asp Cys Thr Gly Thr Glu Ala His Ile  
 260 265 270

Ser Ser Cys Lys Leu Gly Pro Gln Val Ser Leu Asp Pro Met Lys Asn  
 275 280 285

Val Thr Cys Glu Asn Gly Leu Pro Ala Val Val Ser Cys Val Pro Gly  
 290 295 300

Gln Val Phe Ser Pro Asp Gly Pro Ser Arg Phe Arg Lys Ala Tyr Lys  
 305 310 315 320

Pro Glu Gln Pro Leu Val Arg Leu Arg Gly Gly Ala Tyr Ile Gly Glu  
 325 330 335

Gly Arg Val Glu Val Leu Lys Asn Gly Glu Trp Gly Thr Val Cys Asp  
 340 345 350

Asp Lys Trp Asp Leu Val Ser Ala Ser Val Val Cys Arg Glu Leu Gly  
 355 360 365

Phe Gly Ser Ala Lys Glu Ala Val Thr Gly Ser Arg Leu Gly Gln Gly  
 370 375 380

Ile Gly Pro Ile His Leu Asn Glu Ile Gln Cys Thr Gly Asn Glu Lys  
 385 390 395 400

Ser Ile Ile Asp Cys Lys Phe Asn Ala Glu Ser Gln Gly Cys Asn His  
 405 410 415

Glu Glu Asp Ala Gly Val Arg Cys Asn Thr Pro Ala Met Gly Leu Gln  
 420 425 430

Lys Lys Leu Arg Leu Asn Gly Gly Arg Asn Pro Tyr Glu Gly Arg Val  
 435 440 445

Glu Val Leu Val Glu Arg Asn Gly Ser Leu Val Trp Gly Met Val Cys  
 450 455 460

Gly Gln Asn Trp Gly Ile Val Glu Ala Met Val Val Cys Arg Gln Leu  
 465 470 475 480

Gly Leu Gly Phe Ala Ser Asn Ala Phe Gln Glu Thr Trp Tyr Trp His



ES 2 387 329 T3

Ser Glu Glu Thr Glu Lys Lys Phe Glu His Phe Ser Gly Leu Leu Asn  
 755 760 765

Asn Gln Leu Ser Pro Gln  
 770

<210> 3

<211> 757

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 3

Met Met Trp Pro Gln Pro Pro Thr Phe Ser Leu Phe Leu Leu Leu Leu  
 1 5 10 15

Leu Ser Gln Ala Pro Ser Ser Arg Pro Gln Ser Ser Gly Thr Lys Lys  
 20 25 30

Leu Arg Leu Val Gly Pro Ala Asp Arg Pro Glu Glu Gly Arg Leu Glu  
 35 40 45

Val Leu His Gln Gly Gln Trp Gly Thr Val Cys Asp Asp Asp Phe Ala  
 50 55 60

Leu Gln Glu Ala Thr Val Ala Cys Arg Gln Leu Gly Phe Glu Ser Ala  
 65 70 75 80

Leu Thr Trp Ala His Ser Ala Lys Tyr Gly Gln Gly Glu Gly Pro Ile  
 85 90 95

Trp Leu Asp Asn Val Arg Cys Leu Gly Thr Glu Lys Thr Leu Asp Gln  
 100 105 110

Cys Gly Ser Asn Gly Trp Gly Ile Ser Asp Cys Arg His Ser Glu Asp  
 115 120 125

Val Gly Val Val Cys His Pro Arg Arg Gln His Gly Tyr His Ser Glu  
 130 135 140

Lys Val Ser Asn Ala Leu Gly Pro Gln Gly Arg Arg Leu Glu Glu Val  
 145 150 155 160

Arg Leu Lys Pro Ile Leu Ala Ser Ala Lys Arg His Ser Pro Val Thr  
 165 170 175

ES 2 387 329 T3

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

ES 2 387 329 T3

Gly Val Val Glu Val Gln Val Glu Val Asn Gly Gly Pro Arg Trp Gly  
 435 440 445

Thr Val Cys Ser Asp His Trp Gly Leu Thr Glu Ala Met Val Thr Cys  
 450 455 460

Arg Gln Leu Gly Leu Gly Phe Ala Asn Phe Ala Leu Lys Asp Thr Trp  
 465 470 475 480

Tyr Trp Gln Gly Thr Pro Glu Ala Lys Glu Val Val Met Ser Gly Val  
 485 490 495

Arg Cys Ser Gly Thr Glu Met Ala Leu Gln Gln Cys Gln Arg His Gly  
 500 505 510

Pro Val His Cys Ser His Gly Pro Gly Arg Phe Ser Ala Gly Val Ala  
 515 520 525

Cys Met Asn Ser Ala Pro Asp Leu Val Met Asn Ala Gln Leu Val Gln  
 530 535 540

Glu Thr Ala Tyr Leu Glu Asp Arg Pro Leu Ser Met Leu Tyr Cys Ala  
 545 550 555 560

His Glu Glu Asn Cys Leu Ser Lys Ser Ala Asp His Met Asp Trp Pro  
 565 570 575

Tyr Gly Tyr Arg Arg Leu Leu Arg Phe Ser Ser Gln Ile Tyr Asn Leu  
 580 585 590

Gly Arg Ala Asp Phe Arg Pro Lys Ala Gly Arg His Ser Trp Ile Trp  
 595 600 605

His Gln Cys His Arg His Asn His Ser Ile Glu Val Phe Thr His Tyr  
 610 615 620

Asp Leu Leu Thr Leu Asn Gly Ser Lys Val Ala Glu Gly His Lys Ala  
 625 630 635 640

Ser Phe Cys Leu Glu Asp Thr Asn Cys Pro Ser Gly Val Gln Arg Arg  
 645 650 655

Tyr Ala Cys Ala Asn Phe Gly Glu Gln Gly Val Ala Val Gly Cys Trp  
 660 665 670

Asp Thr Tyr Arg His Asp Ile Asp Cys Gln Trp Val Asp Ile Thr Asp  
 675 680 685

Val Gly Pro Gly Asp Tyr Ile Phe Gln Val Val Val Asn Pro Thr Asn

ES 2 387 329 T3

690		695		700											
Asp	Val	Ala	Glu	Ser	Asp	Phe	Ser	Asn	Asn	Met	Ile	Arg	Cys	Arg	Cys
705					710					715					720
Lys	Tyr	Asp	Gly	Gln	Arg	Val	Trp	Leu	His	Asn	Cys	His	Thr	Gly	Asp
				725					730					735	
Ser	Tyr	Arg	Ala	Asn	Ala	Glu	Leu	Ser	Leu	Glu	Gln	Glu	Gln	Arg	Leu
			740					745						750	
Arg	Asn	Asn	Leu	Ile											
			755												

<210> 4

<211> 2262

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 4

```

atgcgacctg tcagtgtctg gcagtggagc ccctgggggc tgctgctgtg cctgctgtgc      60
agttcgtgct tggggctctc gtccccttcc acgggccctg agaagaaggc cgggagccag     120
gggcttcggg tccggctggc tggcttcccc aggaagccct acgagggccg cgtggagata     180
cagcgagctg gtgaatgggg caccatctgc gatgatgact tcacgctgca ggctgccac      240
atcctctgcc gggagctggg cttcacagag gccacaggct ggaccacag tgccaaatat     300
ggccctggaa caggccgcat ctggctggac aacttgagct gcagtgggac cgagcagagt     360
gtgactgaat gtgcctcccg gggctggggg aacagtgact gtacgcacga tgaggatgct     420
ggggtcattc gcaaagacca gcgcctccct ggcttctcgg actccaatgt cattgaggta     480
gagcatcacc tgcaagtgga ggaggtgcca attcgaccgc ccggtgggtg gggcagacga     540
cccctgcccc tgacggaggg gctggtggaa gtcaggcttc ctgacggctg gtcgcaagtg     600
tgcgacaaaag gctggagcgc ccacaacagc cacgtggtct gcgggatgct gggcttcccc     660
agcgaaaaga gggtaacgc ggccttctac aggtgctag cccaacggca gcaacactcc     720
tttggctctg atgggggtgc gtgcgtgggc acggaggccc acctctccct ctgttcctg     780
gagttctatc gtgccaatga caccgccagg tgccctgggg ggggccctgc agtgggtgagc     840
tgtgtgccag gccctgtcta cgcggcatcc agtggccaga agaagcaaca acagtcgaag     900
cctcaggggg agggccgtgt ccgtctaaag ggcggcggcc accctggaga gggccgggta     960
gaagtcttga aggccagcac atggggcaca gtctgtgacc gcaagtggga cctgcatgca    1020
gccagcgtgg tgtgtcggga gctgggcttc gggagtgtct gagaagctct gagtggcgct    1080

```

ES 2 387 329 T3

cgcatggggc agggcatggg tgctatccac ctgagtgaag ttcgctgctc tggacaggi  
 ctctccctct ggaagtgcc ccacaagaac atcacagctg aggattgttc acatagccag 1200  
 gatgccgggg tccggtgcaa cctaccttac actggggcag agaccaggat ccgactcagt 1260  
 gggggccgca gccaacatga ggggcgagtc gaggtgcaaa tagggggacc tgggcccctt 1320  
 cgctggggcc tcatctgtgg ggatgactgg gggaccctgg aggccatggt ggcctgtagg 1380  
 caactgggtc tgggctacgc caaccaagc ctgcaggaga cctggtactg ggactctggg 1440  
 aatataacag aggtggtgat gagtggagtg cgctgcacag ggactgagct gtccctggat 1500  
 cagtgtgccc atcatggcac ccacatcacc tgcaagagga cagggaccgc cttcactgct 1560  
 ggagtcatct gttctgagac tgcatcagat ctgttgctgc actcagcact ggtgcaggag 1620  
 accgcctaca tcgaagaccg gccctgcat atgttgact gtgctgcgga agagaactgc 1680  
 ctggccagct cagcccgtc agccaactgg ccctatggtc accggcgtct gctccgattc 1740  
 tcctcccaga tccacaacct gggacgagct gacttcaggc ccaaggctgg gcgccactcc 1800  
 tgggtgtggc acgagtgcca tgggcattac cacagcatgg acatcttcac tcaactatgat 1860  
 atcctcacc caaatggcac caaggtggct gagggccaca aagctagttt ctgtctcgaa 1920  
 gacactgagt gtcaggagga tgtctccaag cggtatgagt gtgccaaact tggagagcaa 1980  
 ggcactactg tgggttgctg ggatctctac cgcatgaca ttgactgtca gtggattgac 2040  
 atcacggatg tgaagccagg aaactacatt ctccaggttg tcatcaacc aaactttgaa 2100  
 gtagcagaga gtgactttac caacaatgca atgaaatgta actgcaaata tgatggacat 2160  
 agaactctgg tgcacaactg ccacattggt gatgccttca gtgaagaggc caacaggagg 2220  
 tttgaacgct accctggcca gaccagcaac cagattatct aa 2262

<210> 5

<211> 1725

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 5

atggctctgg cccgaggcag ccggcagctg ggggccctgg tgtggggcgc ctgctgtgc 60  
 gtgctggtgc acgggcagca ggcgcagccc gggcagggtc cggaccccgc ccgctggcgg 120  
 cagctgatcc agtgggagaa caacgggcag gtgtacagct tgctcaactc gggctcagag 180  
 tacgtgccgg ccggacctca gcgctccgag agtagctccc gggtgctgct ggccggcggc 240  
 ccccaggccc agcagcggcg cagccacggg agccccggc gtcggcaggc gccgtccctg 300  
 cccctgccgg ggcgcgtggg ctccggacacc gtgcgcggcc aggcgcggca cccattcggc 360

ES 2 387 329 T3

tttggccagg tgcccgacaa ctggcgcgag gtggccgtcg gggacagcac gggcatgg  
 ctggcccgca cctccgtctc ccagcaacgg cacgggggct ccgcctctc ggtctcggct 480  
 tcggccttcg ccagcaccta ccgccagcag ccctctacc cgcagcagtt ccctaccgg 540  
 caggcgccct tcgtcagcca gtacgagaac tacgaccccg cgtcgcggac ctacgaccag 600  
 ggtttcgtgt actaccggcc cgcgggcggc ggcgtgggcg cgggggcggc ggccgtggcc 660  
 tcggcggggg tcatctacct ctaccagccc cgggcgcgct acgaggagta cggcggcggc 720  
 gaagagctgc ccgagtacct gcctcagggc ttctaccggc cccccgagag gccctacgtg 780  
 ccgccgccgc cgcgccccc ccagcgcctg gaccgccgct actcgcacag tctgtacagc 840  
 gagggcaccc ccggcttcga gcaggcctac cctgaccccg gtcccagggc ggcgcaggcc 900  
 catggcggag acccacgcct gggctggtac ccgccctacg ccaaccgcc gcccgaggcg 960  
 tacgggccgc cgcgcgcgct ggagccgcc tacctgccgg tgcgcagctc cgacacgcc 1020  
 ccgccgggtg gggagcggaa cggcgcgcag cagggcgcc tcagcgtagg cagcgtgtac 1080  
 cggcccaacc agaacggccg cggctcctct gacttggctc cagaccccaa ctatgtgcaa 1140  
 gcatccactt atgtgcagag agcccacctg tactccctgc gctgtgctgc ggaggagaag 1200  
 tgtctggcca gcacagcta tgcccctgag gccaccgact acgatgtgcg ggtgctactg 1260  
 cgcttcccc agcgcgtgaa gaaccagggc acagcagact tcctcccaa cggccacgg 1320  
 cacacctggg agtggcacag ctgccaccag cattaccaca gcatggacga gttcagccac 1380  
 tacgacctac tggatgcagc cacaggcaag aaggtggccg agggccacaa ggccagtttc 1440  
 tgcttgagg acagcacctg tgacttcggc aacctcaagc gctatgcatg cacctctcat 1500  
 acccagggcc tgagcccagg ctgctatgac acctacaatg cggacatcga ctgccagtgg 1560  
 atcgacataa ccgacgtgca gcctgggaac tacatcctca aggtgcacgt gaacccaaag 1620  
 tatattgttt tggagtctga cttcaaccaac aacgtggtga gatgcaacat tcactacaca 1680  
 ggtcgtacg tttctgcaac aaactgcaaa attgtccaat cctga 1725

<210> 6

<211> 574

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 6

Met Ala Leu Ala Arg Gly Ser Arg Gln Leu Gly Ala Leu Val Trp Gly  
 1 5 10 15

Ala Cys Leu Cys Val Leu Val His Gly Gln Gln Ala Gln Pro Gly Gln  
 20 25 30

ES 2 387 329 T3

Gly Ser Asp Pro Ala Arg Trp Arg Gln Leu Ile Gln Trp Glu Asn Asn  
 35 40 45

Gly Gln Val Tyr Ser Leu Leu Asn Ser Gly Ser Glu Tyr Val Pro Ala  
 50 55 60

Gly Pro Gln Arg Ser Glu Ser Ser Ser Arg Val Leu Leu Ala Gly Ala  
 65 70 75 80

Pro Gln Ala Gln Gln Arg Arg Ser His Gly Ser Pro Arg Arg Arg Gln  
 85 90 95

Ala Pro Ser Leu Pro Leu Pro Gly Arg Val Gly Ser Asp Thr Val Arg  
 100 105 110

Gly Gln Ala Arg His Pro Phe Gly Phe Gly Gln Val Pro Asp Asn Trp  
 115 120 125

Arg Glu Val Ala Val Gly Asp Ser Thr Gly Met Ala Leu Ala Arg Thr  
 130 135 140

Ser Val Ser Gln Gln Arg His Gly Gly Ser Ala Ser Ser Val Ser Ala  
 145 150 155 160

Ser Ala Phe Ala Ser Thr Tyr Arg Gln Gln Pro Ser Tyr Pro Gln Gln  
 165 170 175

Phe Pro Tyr Pro Gln Ala Pro Phe Val Ser Gln Tyr Glu Asn Tyr Asp  
 180 185 190

Pro Ala Ser Arg Thr Tyr Asp Gln Gly Phe Val Tyr Tyr Arg Pro Ala  
 195 200 205

Gly Gly Gly Val Gly Ala Gly Ala Ala Ala Val Ala Ser Ala Gly Val  
 210 215 220

Ile Tyr Pro Tyr Gln Pro Arg Ala Arg Tyr Glu Glu Tyr Gly Gly Gly  
 225 230 235 240

Glu Glu Leu Pro Glu Tyr Pro Pro Gln Gly Phe Tyr Pro Ala Pro Glu  
 245 250 255

Arg Pro Tyr Val Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Asp Gly Leu Asp Arg  
 260 265 270

Arg Tyr Ser His Ser Leu Tyr Ser Glu Gly Thr Pro Gly Phe Glu Gln  
 275 280 285

ES 2 387 329 T3

Ala Tyr Pro Asp Pro Gly Pro Glu Ala Ala Gln Ala His Gly Gly Asp  
 290 295 300

Pro Arg Leu Gly Trp Tyr Pro Pro Tyr Ala Asn Pro Pro Pro Glu Ala  
 305 310 315 320

Tyr Gly Pro Pro Arg Ala Leu Glu Pro Pro Tyr Leu Pro Val Arg Ser  
 325 330 335

Ser Asp Thr Pro Pro Pro Gly Gly Glu Arg Asn Gly Ala Gln Gln Gly  
 340 345 350

Arg Leu Ser Val Gly Ser Val Tyr Arg Pro Asn Gln Asn Gly Arg Gly  
 355 360 365

Leu Pro Asp Leu Val Pro Asp Pro Asn Tyr Val Gln Ala Ser Thr Tyr  
 370 375 380

Val Gln Arg Ala His Leu Tyr Ser Leu Arg Cys Ala Ala Glu Glu Lys  
 385 390 395 400

Cys Leu Ala Ser Thr Ala Tyr Ala Pro Glu Ala Thr Asp Tyr Asp Val  
 405 410 415

Arg Val Leu Leu Arg Phe Pro Gln Arg Val Lys Asn Gln Gly Thr Ala  
 420 425 430

Asp Phe Leu Pro Asn Arg Pro Arg His Thr Trp Glu Trp His Ser Cys  
 435 440 445

His Gln His Tyr His Ser Met Asp Glu Phe Ser His Tyr Asp Leu Leu  
 450 455 460

Asp Ala Ala Thr Gly Lys Lys Val Ala Glu Gly His Lys Ala Ser Phe  
 465 470 475 480

Cys Leu Glu Asp Ser Thr Cys Asp Phe Gly Asn Leu Lys Arg Tyr Ala  
 485 490 495

Cys Thr Ser His Thr Gln Gly Leu Ser Pro Gly Cys Tyr Asp Thr Tyr  
 500 505 510

Asn Ala Asp Ile Asp Cys Gln Trp Ile Asp Ile Thr Asp Val Gln Pro  
 515 520 525

Gly Asn Tyr Ile Leu Lys Val His Val Asn Pro Lys Tyr Ile Val Leu  
 530 535 540

ES 2 387 329 T3

Glu Ser Asp Phe Thr Asn Asn Val Val Arg Cys Asn Ile His Tyr Thr  
 545 550 555 560

Gly Arg Tyr Val Ser Ala Thr Asn Cys Lys Ile Val Gln Ser  
 565 570

<210> 7

<211> 1254

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 7

```

atgcgcttcg cctggaccgt gctcctgctc gggcctttgc agctctgctc gctagtgcac 60
tgcgcccctc ccgccgccgg ccaacagcag cccccgcgcg agccgccggc ggctccgggc 120
gcctggcgcc agcagatcca atgggagaac aacgggcagg tgttcagctt gctgagcctg 180
ggctcacagt accagcctca gcgccgccgg gaccggggcg ccgccgtccc tggcgcagcc 240
aacgcctccg cccagcagcc ccgcactccg atcctgctga tccgcgacaa ccgcaccgcc 300
gcgggcgcaa cgcgggacggc cggtcatctt ggagtcaccg ctggccgccc caggcccacc 360
gcccgtcact ggttccaagc tggctactcg acatctagag cccgcgaagc tggcgcctcg 420
cgcgcggaga accagacagc gccgggagaa gttcctgctc tcagtaacct gcggccgccc 480
agccgcgtgg acggcatggt gggcgacgac cttacaacc cttacaagta ctctgacgac 540
aaccccttatt acaactacta cgatacttat gaaaggccca gacctggggg caggtaccgg 600
cccggatacg gcaactggta cttccagtac ggtctcccag acctggtggc cgaccctac 660
tacatccagg cgtccacgta cgtgcagaag atgtccatgt acaacctgag atgcgcggcg 720
gaggaaaact gtctggccag tacagcatac agggcagatg tcagagatta tgatcacagg 780
gtgctgctca gatttcccca aagagtgaaa aaccaagga catcagattt cttaccagc 840
cgaccaagat attcctggga atggcacagt tgtcatcaac attaccacag tatggatgag 900
tttagccact atgacctgct tgatgccaac acccagagga gagtggctga aggccacaaa 960
gcaagtttct gtcttgaaga cacatcctgt gactatggct accacaggcg atttgcatgt 1020
actgcacaca cacagggatt gagtcctggc tgttatgata cctatggtgc agacatagac 1080
tgccagtgga ttgatattac agatgtaaaa cctggaaact atatcctaaa ggtcagtgta 1140
aaccccagct acctggttcc tgaatctgac tataccaaca atgttgtgcg ctgtgacatt 1200
cgctacacag gacatcatgc gtatgcctca ggctgcacaa tttcaccgta ttag 1254
    
```

10 <210> 8

<211> 417

<212> PRT

ES 2 387 329 T3

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Arg Phe Ala Trp Thr Val Leu Leu Leu Gly Pro Leu Gln Leu Cys  
 1 5 10 15

Ala Leu Val His Cys Ala Pro Pro Ala Ala Gly Gln Gln Gln Pro Pro  
 20 25 30

Arg Glu Pro Pro Ala Ala Pro Gly Ala Trp Arg Gln Gln Ile Gln Trp  
 35 40 45

Glu Asn Asn Gly Gln Val Phe Ser Leu Leu Ser Leu Gly Ser Gln Tyr  
 50 55 60

Gln Pro Gln Arg Arg Arg Asp Pro Gly Ala Ala Val Pro Gly Ala Ala  
 65 70 75 80

Asn Ala Ser Ala Gln Gln Pro Arg Thr Pro Ile Leu Leu Ile Arg Asp  
 85 90 95

Asn Arg Thr Ala Ala Ala Arg Thr Arg Thr Ala Gly Ser Ser Gly Val  
 100 105 110

Thr Ala Gly Arg Pro Arg Pro Thr Ala Arg His Trp Phe Gln Ala Gly  
 115 120 125

Tyr Ser Thr Ser Arg Ala Arg Glu Ala Gly Ala Ser Arg Ala Glu Asn  
 130 135 140

Gln Thr Ala Pro Gly Glu Val Pro Ala Leu Ser Asn Leu Arg Pro Pro  
 145 150 155 160

Ser Arg Val Asp Gly Met Val Gly Asp Asp Pro Tyr Asn Pro Tyr Lys  
 165 170 175

Tyr Ser Asp Asp Asn Pro Tyr Tyr Asn Tyr Tyr Asp Thr Tyr Glu Arg  
 180 185 190

Pro Arg Pro Gly Gly Arg Tyr Arg Pro Gly Tyr Gly Thr Gly Tyr Phe  
 195 200 205

Gln Tyr Gly Leu Pro Asp Leu Val Ala Asp Pro Tyr Tyr Ile Gln Ala  
 210 215 220

ES 2 387 329 T3

Ser Thr Tyr Val Gln Lys Met Ser Met Tyr Asn Leu Arg Cys Ala Ala  
 225 230 235 240

Glu Glu Asn Cys Leu Ala Ser Thr Ala Tyr Arg Ala Asp Val Arg Asp  
 245 250 255

Tyr Asp His Arg Val Leu Leu Arg Phe Pro Gln Arg Val Lys Asn Gln  
 260 265 270

Gly Thr Ser Asp Phe Leu Pro Ser Arg Pro Arg Tyr Ser Trp Glu Trp  
 275 280 285

His Ser Cys His Gln His Tyr His Ser Met Asp Glu Phe Ser His Tyr  
 290 295 300

Asp Leu Leu Asp Ala Asn Thr Gln Arg Arg Val Ala Glu Gly His Lys  
 305 310 315 320

Ala Ser Phe Cys Leu Glu Asp Thr Ser Cys Asp Tyr Gly Tyr His Arg  
 325 330 335

Arg Phe Ala Cys Thr Ala His Thr Gln Gly Leu Ser Pro Gly Cys Tyr  
 340 345 350

Asp Thr Tyr Gly Ala Asp Ile Asp Cys Gln Trp Ile Asp Ile Thr Asp  
 355 360 365

Val Lys Pro Gly Asn Tyr Ile Leu Lys Val Ser Val Asn Pro Ser Tyr  
 370 375 380

Leu Val Pro Glu Ser Asp Tyr Thr Asn Asn Val Val Arg Cys Asp Ile  
 385 390 395 400

Arg Tyr Thr Gly His His Ala Tyr Ala Ser Gly Cys Thr Ile Ser Pro  
 405 410 415

Tyr

<210> 9

<211> 752

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 9

Met Arg Pro Val Ser Val Trp Gln Trp Ser Pro Trp Gly Leu Leu Leu



ES 2 387 329 T3

Gly Gly Gly Pro Ala Val Val Ser Cys Val Pro Gly Pro Val Tyr Ala  
 275 280 285

Ala Ser Ser Gly Gln Lys Lys Gln Gln Gln Ser Lys Pro Gln Gly Glu  
 290 295 300

Ala Arg Val Arg Leu Lys Gly Gly Ala His Pro Gly Glu Gly Arg Val  
 305 310 315 320

Glu Val Leu Lys Ala Ser Thr Trp Gly Thr Val Cys Asp Arg Lys Trp  
 325 330 335

Asp Leu His Ala Ala Ser Val Val Cys Arg Glu Leu Gly Phe Gly Ser  
 340 345 350

Ala Arg Glu Ala Leu Ser Gly Ala Arg Met Gly Gln Gly Met Gly Ala  
 355 360 365

Ile His Leu Ser Glu Val Arg Cys Ser Gly Gln Glu Leu Ser Leu Trp  
 370 375 380

Lys Cys Pro His Lys Asn Ile Thr Ala Glu Asp Cys Ser His Ser Gln  
 385 390 395 400

Asp Ala Gly Val Arg Cys Asn Leu Pro Tyr Thr Gly Ala Glu Thr Arg  
 405 410 415

Ile Arg Leu Ser Gly Gly Arg Ser Gln His Glu Gly Arg Val Glu Val  
 420 425 430

Gln Ile Gly Gly Pro Gly Pro Leu Arg Trp Gly Leu Ile Cys Gly Asp  
 435 440 445

Asp Trp Gly Thr Leu Glu Ala Met Val Ala Cys Arg Gln Leu Gly Leu  
 450 455 460

Gly Tyr Ala Asn His Gly Leu Gln Glu Thr Trp Tyr Trp Asp Ser Gly  
 465 470 475 480

Asn Ile Thr Glu Val Val Met Ser Gly Val Arg Cys Thr Gly Thr Glu  
 485 490 495

Leu Ser Leu Asp Gln Cys Ala His His Gly Thr His Ile Thr Cys Lys  
 500 505 510

Arg Thr Gly Thr Arg Phe Thr Ala Gly Val Ile Cys Ser Glu Thr Ala  
 515 520 525

ES 2 387 329 T3

Ser Asp Leu Leu Leu His Ser Ala Leu Val Gln Glu Thr Ala Tyr Ile  
530 535 540

Glu Asp Arg Pro Leu His Met Leu Tyr Cys Ala Ala Glu Glu Asn Cys  
545 550 555 560

Leu Ala Ser Ser Ala Arg Ser Ala Asn Trp Pro Tyr Gly His Arg Arg  
565 570 575

Leu Leu Arg Phe Ser Ser Gln Ile His Asn Leu Gly Arg Ala Asp Phe  
580 585 590

Arg Pro Lys Ala Gly Arg His Ser Trp Val Trp His Glu Cys His Gly  
595 600 605

His Tyr His Ser Met Asp Ile Phe Thr His Tyr Asp Ile Leu Thr Pro  
610 615 620

Asn Gly Thr Lys Val Ala Glu Gly His Lys Ala Ser Phe Cys Leu Glu  
625 630 635 640

Asp Thr Glu Cys Gln Glu Asp Val Ser Lys Arg Tyr Glu Cys Ala Asn  
645 650 655

Phe Gly Glu Gln Gly Ile Thr Val Gly Cys Trp Asp Leu Tyr Arg His  
660 665 670

Asp Ile Asp Cys Gln Trp Ile Asp Ile Thr Asp Val Lys Pro Gly Asn  
675 680 685

Tyr Ile Leu Gln Val Val Ile Asn Pro Asn Phe Glu Val Ala Glu Ser  
690 695 700

Asp Phe Thr Asn Asn Ala Met Lys Cys Asn Cys Lys Tyr Asp Gly His  
705 710 715 720

Arg Ile Trp Val His Asn Cys His Ile Gly Asp Ala Phe Ser Glu Glu  
725 730 735

Ala Asn Arg Arg Phe Glu Arg Tyr Pro Gly Gln Thr Ser Asn Gln Ile  
740 745 750

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición farmacéutica para usar en un procedimiento de tratar un trastorno que se caracteriza por una excesiva formación de vasos sanguíneos, en la que la composición comprende una molécula capaz de regular por disminución un nivel y/o la actividad de LOR-1, en la que la molécula se selecciona de:
  - 5 (a) un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo capaz de unirse a, y al menos inhibir parcialmente la actividad de, LOR-1;
  - (b) un oligonucleótido sintético que hibrida con ADN bicatenario del gen LOR-1;
  - (c) un oligonucleótido antisentido o análogo del mismo que impide la transcripción del ARNm de LOR-1, impide la traducción de ARNm de LOR-1, conduce a la escisión enzimática de un híbrido con ARNm de LOR-1 o conduce a la interferencia con el correcto corte y empalme del ARNm de LOR-1;
  - 10 (d) una ribozima que inhibe la expresión de LOR-1 mediante escisión del ARNm de LOR-1;
  - (e) un oligonucleótido de ARN que activa los mecanismos del ARN de interferencia (ARNi), en el que los mecanismos del ARNi regulan por disminución de la expresión de LOR-1; y
  - (f) una construcción de ácido nucleico que expresa el oligonucleótido antisentido de (c).
- 15 2. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho anticuerpo o dicho fragmento de anticuerpo está dirigido contra al menos una porción del polipéptido establecido en las SEC ID N° 2.
3. Una composición farmacéutica para usar en un procedimiento de tratar un trastorno que se caracteriza por una excesiva formación de vasos sanguíneos, en la que la composición comprende una molécula capaz de regular por disminución un nivel y/o la actividad de lisil oxidasa de un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos del 75 % con el polipéptido establecido en la SEC ID N° 2, en la que la molécula se selecciona de:
  - 20 (a) un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo capaz de unirse a, y al menos inhibir parcialmente la actividad de, LOR-1;
  - (b) un oligonucleótido sintético que hibride con ADN bicatenario del gen LOR-1;
  - 25 (c) un oligonucleótido antisentido o análogo del mismo que impide la transcripción del ARNm de LOR-1, impide la traducción de ARNm de LOR-1, conduce a la escisión enzimática de un híbrido con ARNm de LOR-1 o conduce a la interferencia con el correcto corte y empalme del ARNm de LOR-1;
  - (d) una ribozima que inhibe la expresión de LOR-1 mediante escisión del ARNm de LOR-1;
  - 30 (e) un oligonucleótido de ARN que activa los mecanismos del ARN de interferencia (ARNi), en el que los mecanismos del ARNi regulan por disminución la expresión de LOR-1; y
  - (f) una construcción de ácido nucleico que expresa el oligonucleótido antisentido de (c).
4. La composición de la reivindicación 3, en la que dicho anticuerpo o dicho fragmento de anticuerpo está dirigido contra al menos una porción del polipéptido establecido en las SEC ID N° 2.

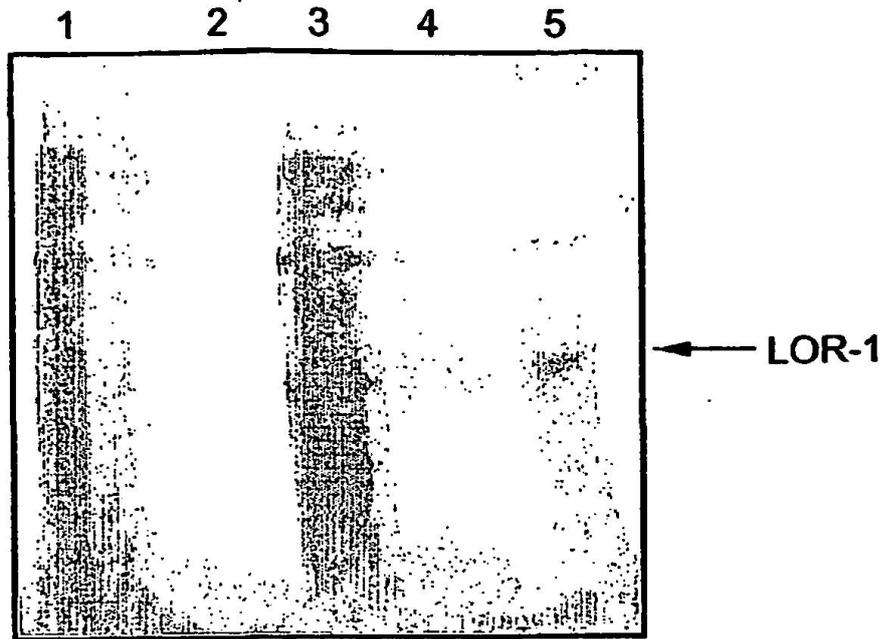


Fig. 1

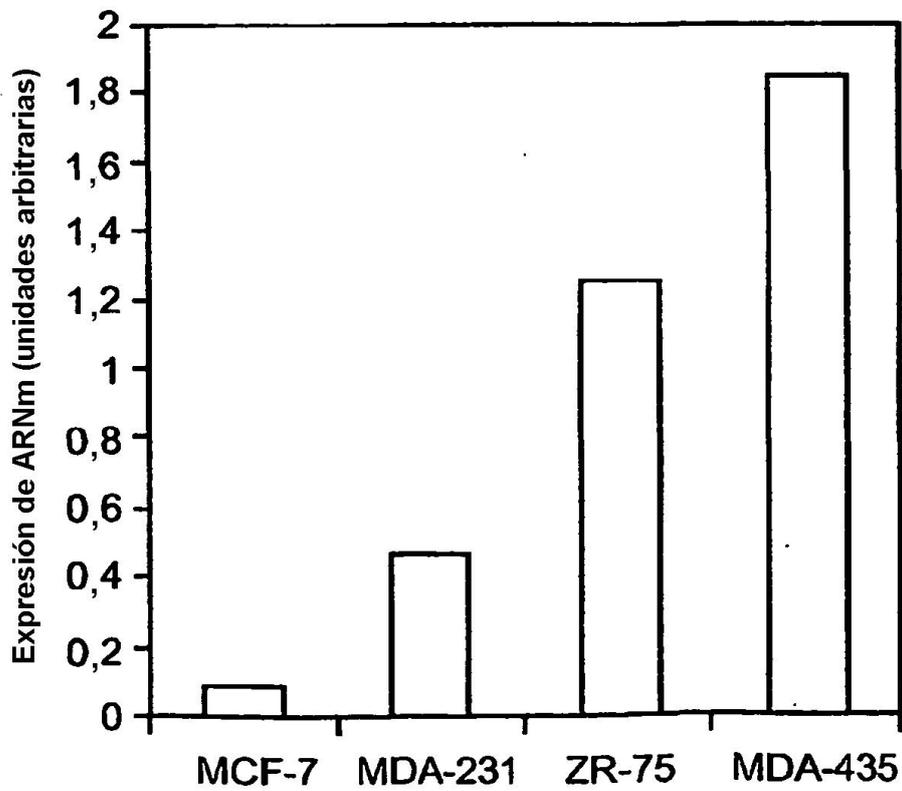


Fig. 2

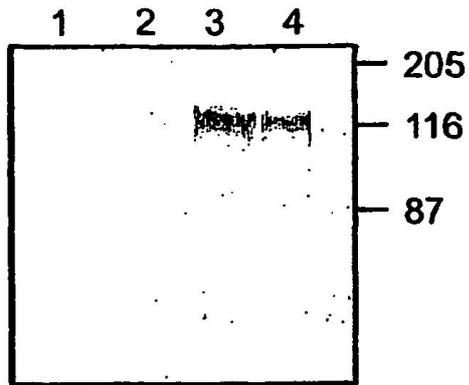


Fig. 3

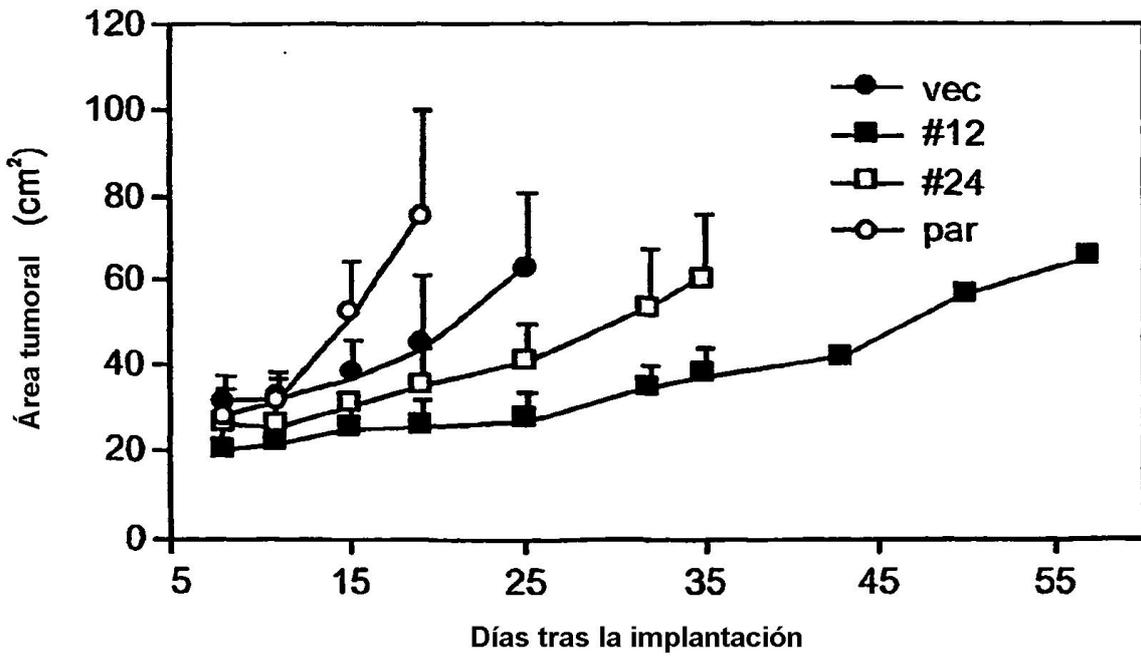
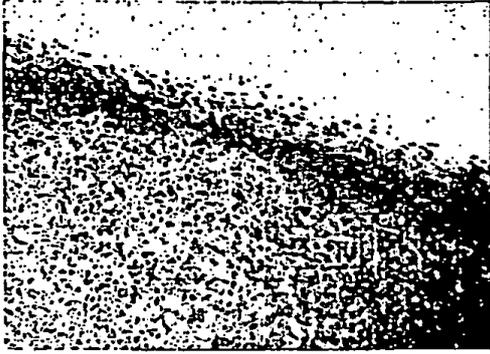
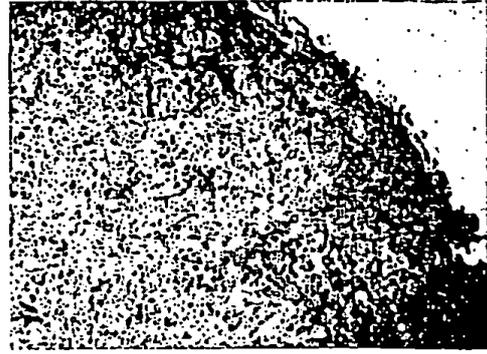


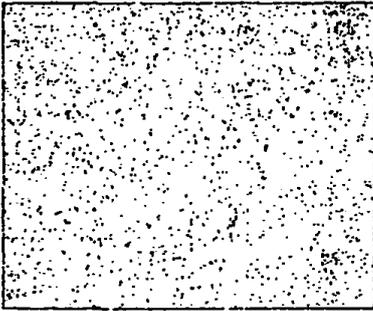
Fig. 4



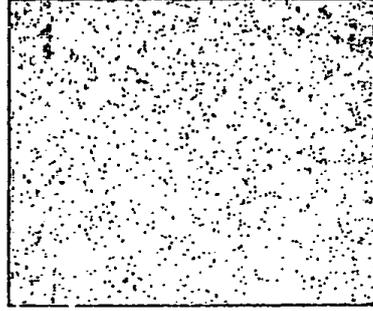
**Fig. 5a**



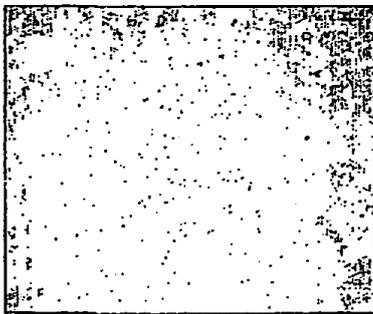
**Fig. 5b**



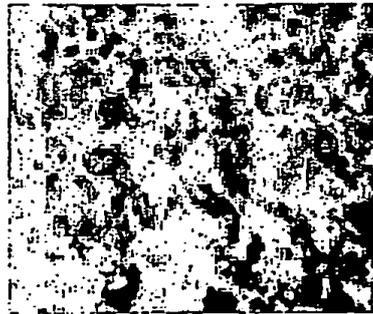
**Fig. 6a**



**Fig. 6b**



**Fig. 6c**



**Fig. 6d**

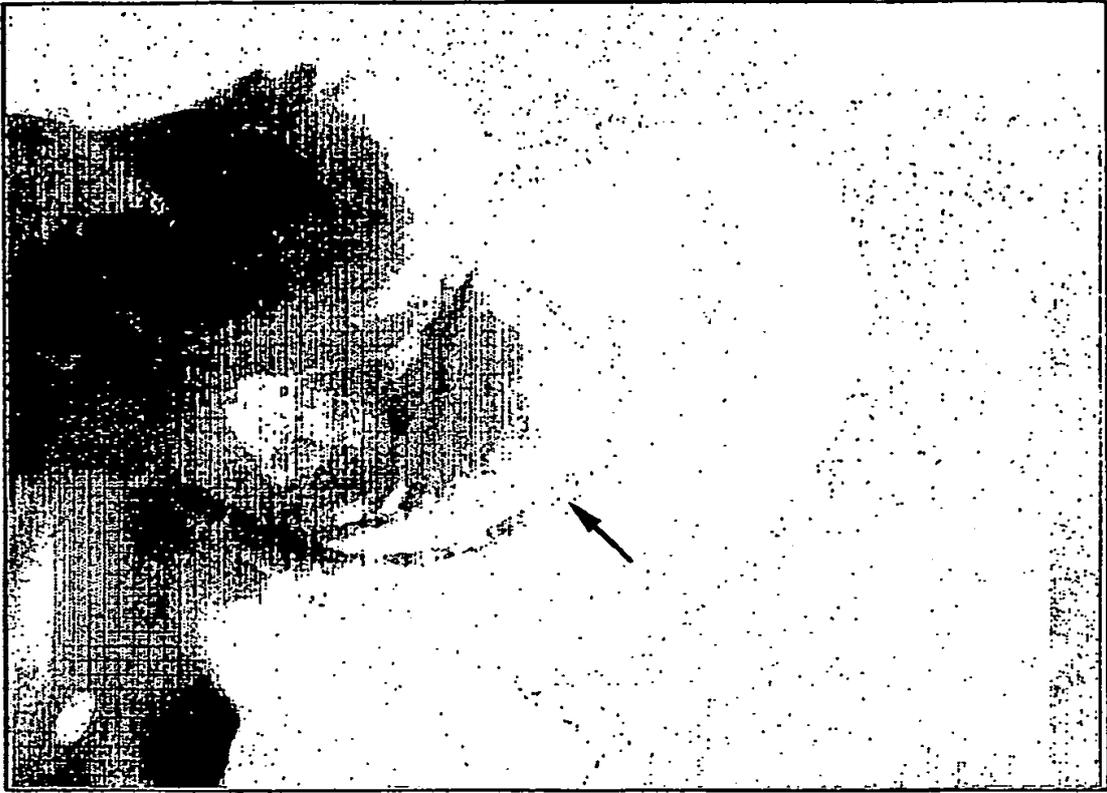


Fig. 7

1 10 20 30 40 50 60 70  
 MERPLCSHLCSLAMLALLSPLSLAQYDSWPHY.....PEYFOCFEAPPEYHPOAPANVAKIOLELALGQKRRKESGEGVEVY  
 hLOR-1  
 hLOR-2  
 LoxC  
 hLol  
 hLo  
 consenso>50

80 90 100 110 120 130 140 150  
 YDQNGTVCDDEFSIHAHVVCRELGYVEEKSTASISYGNKGEPIWLDKHLKICLQENZATLAACTENGWGVTDCKEITLVG  
 RAGEVGTICDDDETLQAFHILCRBLGFTETATCTHSAKYCPETETRIWLDNLSCSCTEQBVTCAERGWGNSDCTHDELAG  
 hLOR-1  
 hLOR-2  
 LoxC  
 hLol  
 hLo  
 consenso>50

160 170 180 190 200 210 220 230  
 VVCSDKRIPEKFDNSLINQIENLNIQVEDIARAIIBTYRKRRTPEVMEGYVEVKEGKTKKQICDKKNTAKNESVVCGMFG  
 hLOR-1  
 hLOR-2  
 LoxC  
 hLol  
 hLo  
 consenso>50

240 250 260 270 280 290 300  
 FFGERTVNTKVKK.....KPAERKQRYWPFPSMDCTGTETAPLPISSCKLGPQVSLDPMKNVTGENGLPAVVSCV  
 hLOR-1  
 hLOR-2  
 LoxC  
 hLol  
 hLo  
 consenso>50

Fig. 8



