

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 125**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07746641 .5**

96 Fecha de presentación: **23.05.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2021473**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.02.2009**

54 Título: **Un método para estimular la angiogénesis usando DKK2 y composición que comprende la misma**

30 Prioridad:

24.05.2006 KR 20060046442

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

18.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

18.12.2012

73 Titular/es:

**THERAGEN ETEX CO., LTD. (100.0%)
1265-6 Jeongwang-dongSiheung-si
Gyeonggi-do 429-848 , KR**

72 Inventor/es:

**KWON, YOUNG GUEN;
MIN, JEONG KI;
YUN, CHAE OK y
KIM, YOUNG MYEONG**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 393 125 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

Un método para estimular la angiogénesis usando DKK2 y composición que comprende la misma

5 **Técnica antecedente**

10 La angiogénesis es un proceso por el cual se forman nuevos vasos sanguíneos capilares. Este proceso raramente sucede en condiciones biológicas normales sino que siempre está acompañado por la embriogénesis, formación del cuero lúteo y curación de heridas. Particularmente, la angiogénesis desempeña un papel importante en la metástasis tumoral (Folkman J y Klagsburn M, Science, 235(4787), pág. 442-447, 1987).

15 El procedimiento de angiogénesis consta de cuatro etapas, es decir, la primera etapa es la disociación de la lámina basal capilar por la acción de la enzima proteasa causada por la estimulación de factores angiogénicos, la segunda etapa es la migración y proliferación de células endoteliales sanguíneas, la tercera etapa es la formación de conductos capilares debido a la diferenciación de las células endoteliales sanguíneas y la cuarta etapa es la reconstrucción de nuevos vasos sanguíneos capilares.

20 Se ha informado de que el proceso de angiogénesis está regulado por diversos factores estimuladores y factores inhibidores, por ejemplo, factores de crecimiento, citoquinas, sustancias del metabolismo lipídico, fragmentos criptogénicos de proteínas hemostáticas, etc. (Folkman J, Nat. Med., 1(1), pág. 27-31, 1995). Los factores estimuladores de la angiogénesis pueden dividirse en varios tipos, por ejemplo, principalmente, factores inductores del crecimiento celular, citoquinas que tienen actividad inmune, hormonas y productos lipídicos, etc. (Bussolino F et al., Trends. Biochem. Sci., 22(7), pág. 251-256, 1997).

25 Sin embargo, los factores estimuladores tienen diversos problemas para aplicarse en uso clínico, ya que actúan no solamente sobre las células endoteliales vasculares, sino también sobre las otras células adyacentes (Malecki M et al., Gene Ther., Supple 1, pág. S159-169, 2005).

30 Por consiguiente, las recientes investigaciones se han centrado en encontrar genes importantes que actúen solamente sobre las células endoteliales sanguíneas, en particular, que estén implicados en la angiogénesis y un nuevo método para tratar diversas enfermedades que requieren angiogénesis usando el gen. Sin embargo, hasta ahora no se han conseguido resultados satisfactorios.

35 La angiogénesis terapéutica es un método para tratar enfermedades isquémicas promoviendo la formación de vasos colaterales a través de la administración de factores angiogénicos tales como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), locus endotelial-1 regulado por el desarrollo (Del-1), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas (PD-EGF), angiopoyetina, factor de crecimiento transformante (TGF) y factor de crecimiento epidérmico (EGF) etc. o el gen que codifica los mismos, y se ha puesto de relieve como un nuevo método para tratar la enfermedad isquémica severa que no podía realizarse por el método de angioplastia coronaria transluminal percutánea (PTCA) e injerto de derivación de la arteria coronaria (CABG) (Kim D.K. y Kwon H.C., The journal of endocrinology, 16(3), pág. 328-338, 2001).

45 Se ha informado de que DKK2, una proteína represora de la proteína Wnt, actúa como factor inhibidor o factor estimulador de las vías de señalización de Wnt (Wu W et al., Curr. Biol., 10(24), pág.1611-1614, 2000). Tiene dos dominios ricos en cisteína específicos y está dividida en diversas longitudes de regiones de conexión. Particularmente, la proteína que pertenece a la familia Dickkopf conserva en gran medida 2 regiones de cisteína entre los miembros de la familia así como 10 cisteínas (Krupnik VE et al., Gene, 238(2), pág. 301-313, 1999). Se ha informado de que DKK2 está estrechamente correlacionada con la diferenciación de osteoclastos (Li X et al., Nat. Genet., 37 (9), pág. 945-952, 2005).

50 Sin embargo, no se ha informado o descrito acerca del efecto sobre la actividad estimuladora de DKK2 sobre la angiogénesis en cualquiera de los trabajos citados anteriormente, cuyas descripciones se incorporan en este documento por referencia.

55 **Descripción de la invención**

Problema técnico

60 Por consiguiente, los presentes inventores de la presente invención han estudiado intensivamente para encontrar varios genes de control de la diferenciación en células endoteliales para proporcionar tratamiento alternativo y prevención de enfermedades isquémicas.

Solución técnica

65 De acuerdo con la presente invención, la presente invención proporciona un método para fabricar un medicamento

para su uso en la estimulación de la angiogénesis en un mamífero, que comprende la etapa de administrar al tejido no formado vascular del mamífero una cantidad eficaz de proteína DKK2 o ADN que codifica la proteína DKK2.

5 La expresión "tejido no formado vascular del mamífero" descrita en este documento comprende tejido dérmico, tejido muscular y tejido conectivo recién formado después de la lesión causada por una enfermedad isquémica en un mamífero.

10 La expresión "enfermedad isquémica" descrita en este documento comprende quemaduras, psoriasis, úlceras, isquemia, infarto de miocardio, angina de pecho, infarto cerebral o hemorragia cerebral.

15 La expresión "ADN que codifica la proteína DKK2" descrita en este documento se administra al mamífero usando vectores virales o vectores no virales.

La expresión "vectores no virales" descrita en este documento comprende el plásmido que puede expresarse en células animales.

20 La expresión "vectores virales" descrita en este documento comprende vectores adenovirales, vectores virales adeno-asociados, vectores retrovirales, vectores lentivirales o vectores del virus del herpes simple.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que comprende la proteína DKK2 o el ADN que codifica la proteína DKK2 como ingrediente activo en una cantidad eficaz para tratar y prevenir enfermedades isquémicas.

25 Otro objeto de la presente invención es proporcionar un uso de la proteína DKK2 o el ADN que codifica la proteína DKK2 para la fabricación de medicinas empleadas para tratar o prevenir enfermedades isquémicas.

30 Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para tratar o prevenir enfermedades isquémicas, donde dicho método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína DKK2 o el ADN que codifica la proteína DKK2 en el mamífero que padece las enfermedades causada por la angiogénesis.

Además, otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición alimenticia de atención sanitaria que comprende la proteína DKK2 o el ADN que codifica la proteína DKK2 como ingrediente activo en una cantidad eficaz para prevenir y aliviar enfermedades isquémicas.

35 La expresión "proteína DKK2" descrita en este documento comprende los aminoácidos representados por la SEC ID N° 1.

40 La expresión "ADN que codifica la proteína DKK2" descrita en este documento comprende el gen representado por la SEC ID N° 2.

Las secuencias de DKK2 descritas anteriormente no están limitadas a las secuencias de DKK2 de mamífero, sino que comprenden todas las DKK2 de mamíferos.

45 La proteína DKK2 descrita anteriormente comprende la proteína DKK2 aislada de los tejidos de mamífero o proteínas DKK2 recombinantes.

La proteína DKK2 de la invención o el ADN que codifica la proteína DKK2 pueden prepararse de acuerdo con la siguiente realización preferida.

50 A partir de ahora en este documento, la presente invención se describe en detalle.

55 Para la presente invención, la proteína DKK2 descrita anteriormente y el gen que codifica la misma pueden prepararse por el siguiente procedimiento. En el ARN completo, purificado de HUVEC se realiza la transcripción inversa para obtener el ADN complementario; se realiza PCR con el ADN complementario obtenido como molde y cebadores de DKK2, preferiblemente, los cebadores de DKK2 representados por las SEC ID N° 5 y SEC ID N° 6 para obtener los genes de DKK2 amplificados.

60 Las proteínas DKK2 descritas anteriormente pueden obtenerse por el siguiente proceso, por ejemplo, los genes de DKK2 preparados por la etapa descrita anteriormente se tratan con enzimas de restricción, se clonan en plásmidos para obtener el plásmido, que puede clonarse y transformarse con líneas celulares de expresión; las células transformadas se seleccionan y las proteínas DKK2 secretadas en el medio se purifican con columna; o los genes de DKK2 preparados por la etapa descrita anteriormente se inducen en un vector, preferiblemente un vector lentiviral, se cultivan en medio, y las proteínas DKK2 secretadas en el medio se purifican con columna.

65 Las líneas celulares inducidas con DKK2 y el gen DKK2 preparado por la etapa descrita anteriormente, muestran actividades estimuladores de formación de conductos en HUVEC, actividad promotora de brote en tejidos del círculo

arterial y actividad promotora del desarrollo vascular de embriones en ratón. Además, no solamente la longitud completa de DKK2 sino también fragmentos de DKK2 muestran actividad estimuladora similar de la angiogénesis entre sí.

5 Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que comprende la proteína DKK2 o el ADN que codifica la proteína DKK2 preparada a partir del método descrito anteriormente como ingrediente activo en una cantidad eficaz para tratar y prevenir enfermedades isquémicas.

10 Otro objeto de la presente invención es proporcionar un uso de una proteína DKK2 o ADN que codifica la proteína DKK2 preparada a partir del método descrito anteriormente para la fabricación de medicinas empleadas para tratar o prevenir enfermedades isquémicas.

15 Otro objeto de la presente invención es proporcionara un método para tratar o prevenir enfermedades isquémicas, donde dicho método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína DKK2 o ADN que codifica la proteína DKK2 preparada a partir del método descrito anteriormente en el mamífero que padece la enfermedad isquémica.

20 La composición de la invención para tratar enfermedades isquémicas puede comprender la proteína DKK2 descrita anteriormente o el ADN que codifica la misma como el 0,1 - 50% en peso en base al peso total de la composición.

25 La composición de la invención puede comprender adicionalmente vehículos, adyuvantes o diluyentes convencionales de acuerdo con un método de uso bien conocido en la técnica. Es preferible que dicho vehículo se use como sustancia apropiada de acuerdo con el método de uso y aplicación, pero son limitación del mismo. Los diluyentes apropiados se enumeran en el texto escrito de Remington's Pharmaceutical Science (Mack Publishing co, Easton PA).

A partir de ahora en este documento, los siguientes métodos de formulación y excipientes son meramente ejemplares y no limitan de ningún modo la invención.

30 La composición de acuerdo con la presente invención puede proporcionarse como una composición farmacéutica que contiene vehículos, adyuvantes o diluyentes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidones, goma arábica, alginato, gelatina, fosfato cálcico, silicato cálcico, celulosa, metilcelulosa, polivinilpirrolidona, agua, metilhidroxibenzoato, propilhidroxibenzoato, talco, estearato de magnesio y aceite mineral. Las formulaciones pueden incluir adicionalmente cargas, agentes anti-aglutinación, agentes lubricantes, agentes humectantes, agentes aromatizantes, emulsionantes, conservantes y similares. Las composiciones de la invención pueden formularse para proporcionar liberación rápida, sostenida o retardada del ingrediente activo después de su administración a un paciente empleando cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica.

40 Por ejemplo, las composiciones de la presente invención pueden disolverse en aceites, propilenglicol u otros disolventes que se usan habitualmente para producir una inyección. Ejemplos adecuados de los vehículos incluyen solución salina fisiológica, polietilenglicol, etanol, aceites vegetales, miristato de isopropilo, etc., pero sin limitación de los mismos. Para administración tópica, la composición de la presente invención puede formularse en forma de pomadas y cremas.

45 Las formulaciones farmacéuticas que contienen la presente composición pueden prepararse en cualquier forma, tal como forma de dosificación oral (polvo, comprimido, cápsula, cápsula blanda, medicina acuosa, jarabe, elixires, píldora, polvo, sobrecito, gránulo), o preparación tópica (crema, pomada, loción, gel, bálsamo, parche, pasta, solución de pulverización, aerosol y similares), o preparación inyectable (solución, suspensión, emulsión).

50 Por ejemplo, las composiciones de la presente invención pueden disolverse en aceites, propilenglicol u otros disolventes que se usan habitualmente para producir una inyección. Ejemplos adecuados de la base o vehículo en la inyección incluyen diversas mezclas salinas tales como solución salina fisiológica, sal inorgánica o la mezcla de las mismas; solución de azúcar tal como manitol, lactosa, dextrano etc.; aminoácidos tales como glicina, arginina etc.; polietilenglicol, etanol, aceites vegetales, miristato de isopropilo, solución de ácido orgánico, solución salina, o la mezcla de los mismos etc., pero sin limitación de los mismos. La preparación inyectable de la presente invención puede prepararse añadiendo aditivos convencionales en inyección, por ejemplo, un controlador osmótico, controlador del pH, aceite vegetal, lecitina, tensioactivo tal como tensioactivo no iónico a la base descrita anteriormente para preparar una formulación apropiada tal como solución, suspensión, solución coloidal, etc. En caso de una composición sólida de la presente invención, la composición se disuelve en una base esterilizada antes de su uso in situ en terapia genética y la composición líquida de la presente invención puede usarse directamente sin tratamiento particular.

65 Para administración tópica, la composición de la presente invención puede formularse en forma de pomadas y cremas.

La composición de la presente invención en formas farmacéuticas de dosificación puede usarse en forma de sus sales farmacéuticamente aceptables, y también puede usarse sola o en asociación apropiada, así como en combinación con otros ingredientes farmacéuticamente activos.

5 El ADN que codifica la proteína DKK2 descrita en este documento a suministrar en la parte afectada puede usarse en la forma insertada de vectores, por ejemplo vectores adenovirales, vectores virales adeno-asociados, vectores retrovirales, vectores lentivirales, vectores del virus del herpes simple o plásmidos expresados en células de mamífero.

10 La dosis deseable de la composición de la invención varía dependiendo del estado y el peso del sujeto, la gravedad, la forma del fármaco, la vía y periodo de administración, y pueden elegirla los especialistas en la técnica. Sin embargo, para obtener efectos deseables, generalmente se recomienda administran una cantidad que varía de 0,001 a 100 mg/kg, preferiblemente de 0,1 a 100 mg/kg por peso/día de la proteína de la invención o ADN de la presente invención. La dosis puede administrarse de una sola vez o dividida en varias veces por día.

15 Otro objeto más de la presente invención es proporcionar una alimento de asistencia sanitaria que comprende la proteína DKK2 o el ADN que codifica la proteína DKK2 como ingrediente activo para prevenir y mejorar una enfermedad isquémica.

20 La composición descrita anteriormente de este documento puede añadirse a un alimento, aditivo o bebida, donde la cantidad de la proteína o ADN descrito anteriormente en el alimento o bebida puede variar generalmente de aproximadamente el 0,01 al 95% en peso, preferiblemente del 1 al 80% en peso del peso total del alimento para la composición alimenticia de asistencia sanitaria.

25 La presente invención proporciona una composición de la bebida de atención sanitaria que comprende la proteína DKK2 o el ADN que codifica la proteína DKK2 para prevenir y aliviar enfermedades isquémicas en mamíferos.

30 Para desarrollar un alimento de asistencia sanitaria, ejemplos de alimentos que pueden añadirse que comprenden la proteína DKK2 descrita anteriormente o el ADN que codifica la proteína DKK2 de la presente invención son diversos alimentos, bebidas, gomas, complejos vitamínicos, alimentos que mejoran la salud y similares, y pueden usarse en forma de un polvo, gránulo, comprimido, comprimido masticable, cápsula o bebida, etc.

35 La composición de la invención de la presente invención no tiene toxicidad y efectos adversos, por lo tanto puede usarse con seguridad.

40 La composición descrita anteriormente en este documento puede añadirse a un alimento, aditivo o bebida donde, la cantidad de la proteína DKK2 descrita anteriormente o el ADN que codifica la proteína DKK2 en el alimento o bebida puede variar generalmente de aproximadamente el 0,01 al 80% p/p, preferiblemente del 0,01 al 15% p/p del peso total del alimento para la composición alimenticia para la salud y de 0,02 a 5 g, preferiblemente de 0,3 a 1 g en la proporción de 100 ml de la composición de bebida de asistencia sanitaria.

45 Con la condición de que la composición de bebida de asistencia sanitaria de la presente invención contenga la proteína DKK2 descrita anteriormente o el ADN que codifica la proteína DKK2 como componente esencial en la proporción indicada, no hay limitación particular sobre el otro componente líquido, donde el otro componente puede ser diversos desodorante o carbohidratos naturales, etc. tal como una bebida convencional. Ejemplos de carbohidratos naturales mencionados anteriormente son monosacáridos tales como glucosa, fructosa etc.; disacáridos tales como maltosa, sacarosa etc.; azúcares convencionales tales como dextrina, ciclodextrina; y alcoholes de azúcares tales como xilitol, y eritritol etc. Como desodorante diferente de los mencionados anteriormente, pueden usarse favorablemente desodorantes naturales tales como taumatina, extracto de stevia tal como levaudiósido A, glicirizina y otros, y desodorantes sintéticos tales como sacarina, aspartamo y otros. La cantidad del natural carbohidrato descrito anteriormente varía generalmente de aproximadamente 1 a 20 g, preferiblemente de 5 a 12 g en la proporción de 100 de la presente composición de bebida.

55 Los componentes diferentes de la composición mencionada anteriormente son diversos nutrientes, una vitamina, un mineral o un electrolito, agente aromatizante sintético, un agente colorante y agente de mejora en caso de queso, chocolate y otros, ácido hético y la sal del mismo, ácido algínico y la sal del mismo, ácido orgánico, adhesivo coloidal protector, agente de control del pH, estabilizante, un conservante, glicerina, alcohol, agente carbonizante usado en bebidas carbonatadas y otros. El componente diferente de los mencionados anteriormente puede ser zumo de frutas para preparar zumo de frutas natural, bebida de zumo de frutas y bebida vegetal, donde el componente puede usarse independientemente o en combinación. La proporción de los componentes no es tan importante pero generalmente es el intervalo de aproximadamente el 0 al 20% p/p por 100% p/p de la presente composición. Ejemplos de alimentos que se pueden añadir que comprenden el extracto mencionado anteriormente en este documento son diversos alimentos, bebidas, gomas, complejos vitamínicos, alimentos de mejora de la salud y similares.

65

5 La composición de la invención puede comprender adicionalmente uno o más de uno de ácido orgánico, tal como ácido cítrico, ácido fumárico, ácido adípico, ácido láctico, ácido málico; fosfato, tal como fosfato, fosfato sódico, fosfato potásico, pirofosfato ácido, polifosfato; anti-oxidantes naturales, tales como polifenol, catequina, α -tocoferol, extracto de romero, vitamina C, extracto de té verde, extracto de raíz de regaliz, quitosana, ácido tánico, ácido fítico etc.

La proteína DKK2 de la invención descrita anteriormente o el ADN que codifica la proteína DKK2 puede ser del 20 al 90% de líquido altamente concentrado, polvo, o tipo gránulo.

10 Asimismo, la proteína DKK2 descrita anteriormente o el ADN que codifica la proteína DKK2 puede comprender adicionalmente uno o más de uno de lactosa, caseína, dextrosa, glucosa, sacarosa y sorbitol.

La proteína DKK2 de la invención o el ADN que codifica la proteína DKK2 de la presente invención no tiene toxicidad y efectos adversos, por lo tanto puede usarse con seguridad.

15 **Efectos ventajosos**

20 Como se describe en la presente invención, la proteína DKK2 o el ADN que codifica la proteína DKK2 mostró actividad estimuladora de la formación de conductos en HUVEC, actividad promotora del brote de tejidos del círculo arterial y actividad promotora del desarrollo vascular en los embriones de ratón. Por lo tanto, puede usarse como agente terapéutico o alimento saludable funcional para tratar y prevenir enfermedades isquémicas.

Breve descripción de los dibujos

25 Los anteriores objetos, características y otros, y otras ventajas de la presente invención se entenderán más claramente a partir de la siguiente descripción detallada tomada en conjunto con los dibujos adjuntos, en los que;

30 la Fig. 1 muestra la característica de diferenciación de las HUVEC (células endoteliales de vena umbilical humana) en Matrigel,

la Fig. 2 representa la expresión del gen de DKK2 sobre la diferenciación de las HUVEC,

35 la Fig. 3 representa el resultado de producción de la línea celular de expresión de DKK2 y la línea celular de represión de DKK2 usando lentivirus,

la Fig. 4 muestra el resultado de comparación de la formación de conductos sobre las líneas celulares de expresión y represión de DKK2,

40 la Fig. 5 representa el resultado de aumento de la proteína β -catenina por el tratamiento de DKK2 distinta de la señal de Wnt,

la Fig. 6 presenta el diagrama de vector para la producción de ratón transgénico para DKK2,

45 la Fig. 7 representa la confirmación del ratón transgénico para DKK2 por amplificación de ADN,

la Fig. 8 presenta la inducción del brote de células endoteliales desde la aorta del ratón transgénico para DKK2

50 la Fig. 9 muestra el desarrollo de vasos sobre embriones de ratón normal y ratón transgénico para DKK2 usando el anticuerpos de vWF que es proteína específica de vasos,

la Fig. 10 muestra los resultados de comparación de la angiogénesis sobre la región de la cabeza de embriones de ratón normal y ratón transgénico para DKK2,

55 la Fig. 11 presenta el crecimiento de la aorta descendente y el vaso segmentario en los embriones de ratón normal y ratón transgénico para DKK2.

Mejor modo de realizar la invención

60 La presente invención se explica más específicamente por los siguientes ejemplos. Sin embargo, debe entenderse que la presente invención no está limitada a estos ejemplos.

Modo para la invención

65 El siguiente Ejemplo de Referencia y Ejemplos Experimentales pretenden ilustrar adicionalmente la presente invención sin limitar su alcance.

Ejemplo de Referencia 1. Cultivo de HUVEC.

Se aislaron HUVEC (células endoteliales de vena umbilical humana) de los cordones umbilicales obtenidos del departamento de ginecología del Yonsei University Hospital de acuerdo con el siguiente proceso. Después de lavar las venas con tampón de cordón (solución salina tamponada con fosfato con glucosa al 0,2%), se añadió 50 de colagenasa tipo I al 0,2% (Sigma-Aldrich Co., MO, EEUU) a las venas y las venas se dejaron solas a 37°C durante 5 min. Después de añadir 200 de tampón de cordón a las venas a temperatura ambiente, se recogieron las células de las venas separadas del extremo opuesto. El tampón de cordón se añadió a las venas de nuevo para que reaccionara a 37°C. Las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) recogidas se lavar y vertieron al matraz T75 recubierto usado para cultivo tisular con el 0,1% de gelatina. Las células se cultivaron en medio completo EGM™-2 (Cambrex, MD, EEUU) en un incubador de cultivo con CO₂ al 5% a 37°C y cuando las células llegaron a fase confluyente, las células se separaron de la solución de tripsina-EDTA. En el experimento se usaron las células del pase 3-4 obtenidas del proceso anterior.

Ejemplo de Referencia 2. Preparación de líneas celulares reguladas con DKK2 usando vector lentiviral

Los virus recombinados para DKK2 obtenidos de las líneas celulares sobre-expresadas y reprimidas de DKK2 preparadas por transformación de plásmido clonado para la producción viral de líneas celulares usando lentivirus, se adquirieron de MacroGen Inc (Corea del Sur). Unas 48 horas después de la adición de virus DKK2 a las HUVEC preparadas en el Ejemplo de Referencia 2, se realizó la transcripción inversa y polimerización del ARN aislado de las células para confirmar la fase de expresión del ARNm de DKK2 del siguiente modo: se aisló el ARN total usando reactivo TRIzol (Invitrogen, EEUU), se realizó la transcripción inversa usando cebador oligo (dT) y se repitieron los siguientes ciclos de PCR 30 veces usando la transcriptasa inversa (Stratagen, EEUU); pre-des-naturalización a 94°C durante 5 min. usando la polimerasa (Stratagen, EEUU), desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación a 50°C durante 30 segundos usando cebadores y extensión a 72°C durante 30 segundos.

Como se muestra en la Fig. 3, los resultados demuestran que se produjeron bien las líneas celulares de sobre-expresión y las líneas celulares de represión de DKK2.

Ejemplo de Referencia 3. Preparación de ratón transgénico para DKK2

El ratón de sobre-expresión de DKK2 se preparó usando la región reguladora de la transcripción Tie2 activada en células endoteliales vasculares solamente para determinar el efecto del gen de DKK2 sobre la angiogénesis *in vivo* (Schlaeger TM et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94(7), pág. 3058-3063,1997). Como se muestra en la Fig. 6, el gen de DKK2 de ratón representado por la SEC ID N° 4 se trató con HindIII y NotI (NEB, Inglaterra) y se clonó en el vector Psp (Clontech, EEUU). El plásmido clonado se trató con Sall (NEB, Inglaterra) para preparar fragmentos de ADN y los fragmentos de ADN preparados se inyectaron en los óvulos aislados del ratón (C57BL6, Orient Inc, Corea) del que se había estimulado la ovulación por hormona liberadora de gonadotropina (Sigma, EEUU) para inducir la transducción, y después, los óvulos transgénicos para DKK2 se implantaron en un ratón madre sustituta después de fertilización. Se cortó la cola del ratón nacido después de 21ª fertilización, se trató con proteinasa K (Sigma, EEUU) para aislar el ADN, y se amplificó el ADN aislado por PCR [(pre-desnaturalización a 94°C durante 5 min., desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación a 55°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 30 segundos) x30 ciclos y post-extensión a 72°C durante 10 min.] usando los cebadores de DKK2 representados por las SEC ID N° 7 y SEC ID N° 8. (Véase la Fig. 7).

Ejemplo Experimental 1. Espectros de expresión de DKK2 durante la diferenciación de células endoteliales de vena umbilical humana

Se añadieron 250 de Matrigel (Collaborative Biomedical Products, EEUU; densidad: 10 de proteínas/) a las placas de pocillos con el diámetro de 16 y se realizó la polimerización a 37°C durante 30 min. Las HUVEC preparadas en el Ejemplo de Referencia 1 se cultivaron en medio de cultivo M199 (Invitrogen, EEUU) que contenía suero bovino fetal (FBS, Hyclone, EEUU) al 20% (v/v), 100 unidades/ de penicilina (Invitrogen, EEUU), 10 / de estreptomycin (Invitrogen, EEUU), 3 ng/ de bFGF (factor de crecimiento de fibroblastos básico; Upstate Biotechnology, EEUU) y 5 unidades/ de heparina (Sigma, EEUU) y se añadió tripsina a la misma para obtener células cultivadas. Las células se suspendieron en el medio de cultivo y se extendieron en la capa de Matrigel en la concentración de 2X10⁵ células/pocillo para inducir la diferenciación de las células (Véase la Fig. 1).

Como se muestra en la Fig. 1, la diferenciación consta de 3 etapas; la primera etapa es el inicio de la diferenciación usada como grupo de control, la segunda etapa es la formación de estructura tipo vaso sanguíneo debido a la transferencia celular y la tercera etapa es la finalización de la formación de la estructura tipo vaso sanguíneo.

Después de aislar el ARN de las células en cada etapa usando solución de TRIZOL (Invitrogen, EEUU), se realizó la transcripción inversa del ARN aislado usando los cebadores representados por las SEC ID N° 5 y SEC ID N° 6, y la amplificación de acuerdo con el proceso descrito en el Ejemplo de Referencia 3 (Véase la Fig. 2).

Como se muestra en la Fig. 2, los resultados demuestran que la expresión de los genes de DKK2 estaba aumentada durante la formación de conductos. Se ha confirmado que DKK2 es un regulador positivo de la formación de conductos.

5 Ejemplo Experimental 2. El efecto de DKK2 sobre la formación de conductos de células endoteliales de vena umbilical humana

Se añadieron 250 μ l de Matrigel (Collaborative Biomedical Products, EEUU; densidad: 10 mg de proteína/ml) a las placas de pocillos con el diámetro de 160 y se realizó la polimerización a 37°C durante 30 min. Las HUVEC preparadas en el Ejemplo de Referencia 1 se cultivaron en medio de cultivo M199 (Invitrogen, EEUU) que contenía suero bovino fetal (FBS, Hyclone, EEUU) al 20% (v/v), 100 unidades/ml de penicilina (Invitrogen, EEUU), 10 U/ml de estreptomicina (Invitrogen, EEUU), 3 ng/ml de bFGF (factor de crecimiento de fibroblastos básico; Upstate Biotechnology, EEUU) y 5 unidades/ml de heparina (Sigma, EEUU) y se añadió tripsina a la misma para obtener células cultivadas. Las células se suspendieron en el medio de cultivo y se extendieron sobre la capa de Matrigel en la concentración de 2×10^5 células/pocillo para inducir la diferenciación de las células (Véase la Fig. 4). Se trataron 50 ng/ml y 100 ng/ml de DKK2 a ello y después se cultivaron las células durante 20 horas. La velocidad de formación de conductos se midió por un microscopio óptico (ZEISS, Alemania) y el grupo que no se trató con DKK2 se consideró como el grupo de control negativo.

Como se muestra en la Fig. 4, los resultados demuestran que la formación de conductos estuvo inducida en la línea celular de expresión de DKK2, pero disminuida en la línea celular de represión de DKK2.

Ejemplo Experimental 3. El efecto de estabilización de DKK2 sobre β -catenina

Las líneas celulares de sobre-expresión de DKK2 usando el sistema lentiviral preparado en el Ejemplo de Referencia 2 se cultivaron durante 24 h. El medio se reemplazó en medio de cultivo M199 que contenía suero bovino fetal (FBS, Hyclone, EEUU) al 20% (v/v), 100 unidades/ml de penicilina (Invitrogen, EEUU), 10 U/ml de estreptomicina (Invitrogen, EEUU), 3 ng/ml de bFGF (factor de crecimiento de fibroblastos básico; Upstate Biotechnology, EEUU) y 5 unidades/ml de heparina (Sigma, EEUU), y se añadieron 200 ng/ml de sFrizzle (BD bioscience, EEUU) a la misma como inhibidor de secreción de Wnt. Después de cultivar durante 24 h, se trató con tripsina a la misma para obtener las células cultivadas. El ADN se separó de las células usando tampón de lisis que contenía Tris/Cl 100 mM, EDTA 5 mM, betaglicerofosfato 50 mM, NaF 50 mM, Na_3VO_4 100 μ M, PMSF 1 mM, NP-40 al 0,5% y Triton X-100 al 1%. El nivel de expresión del ADN separado se confirmó a través del ensayo de transferencia de western usando el anticuerpo de β -catenina (Upstate Biotechnology, EEUU).

Como se muestra en la Fig. 5, el nivel de expresión de la proteína β -catenina se aumentó significativamente por DKK2 en comparación con el grupo de control (eGFP), y el nivel aumentado no se redujo a pesar del tratamiento con represor de Wnt (sFz). Por consiguiente, se ha confirmado que DKK2 estimula la angiogénesis controlando el nivel de expresión de la proteína β -catenina distinta de la señal de Wnt.

Ejemplo Experimental 4. El efecto de DKK2 sobre el brote de células endoteliales desde la aorta de ratón transgénico para DKK2

La aorta que se había aislado de la región posterior del ratón transgénico para DKK2 preparado en el Ejemplo de Referencia 3 y el ratón normal de 6 semanas de edad se cortaron en el tamaño de 1 mm y los tejidos del círculo arterial se colocaron en placas de 48 pocillos recubiertas con 110 μ l de matrigel. El pocillo se selló de nuevo con 40 μ l de Matrigel y se añadió medio de cultivo de HUVEC (SFM, Invitrogen, EEUU) a cada pocillo lo suficiente hasta que el volumen final alcanzara 200 μ l. Después de 5 días, se contó la cantidad de brotes formados a partir de cada círculo y se comparó la tasa de brotes en el grupo de ratones transgénicos para DKK2 con la del grupo de ratones de control (Véase la Fig. 8). La tasa de brotes se valoró dividiendo los brotes en cinco partes de acuerdo con los siguientes criterios; se asignaron 5 puntos en caso de que las 5 partes hubieran brotado, se asignaron 0 puntos en caso de que ninguna hubiera brotado.

Como puede observarse en la Fig. 8, el resultado demuestra que la formación de brotes de tejidos del ciclo arterial en el ratón transgénico para DKK2 estuvo significativamente aumentada en comparación con la del ratón normal.

Ejemplo Experimental 5. El efecto de DKK2 sobre el desarrollo de vasos sanguíneos en los embriones del ratón transgénico para DKK2

Los embriones proporcionados de la 9ª a 10ª ratonas preñadas normales y transgénicas para DKK-2 se fijaron con paraformaldehído al 4% durante un día y se tiñeron con el anticuerpos de Factor von Willebrand (Vwf) (Chemicon, EEUU) expresado específicamente solamente en células endoteliales vasculares para observar el desarrollo de vasos sanguíneos por el método descrito en la bibliografía (Sadler J. E., J. Thromb. Haemost., 3(8), pág. 1702-1709, 2005).

Como puede observarse en la Fig. 9, los resultados demuestran que la angiogénesis y el desarrollo vascular están generalmente aumentados en los embriones del ratón transgénico para DKK2 en comparación con el ratón normal de control.

5 Para verificar el efecto de DKK2 sobre la angiogénesis de los embriones, se determinó el desarrollo del plexo capilar principal, la aorta descendente y los vasos segmentarios en los embriones preparados por el proceso descrito anteriormente mediante gran aumento.

10 Como se muestra en las Fig. 10 y 11, los resultados demuestran que se promovió el crecimiento significativamente potenciado del plexo capilar principal y el vaso segmentario y la aorta descendente agrandada en embriones de ratones transgénicos para DKK2.

15 A partir de ahora en este documento, se describirán los métodos de formulación y los tipos de excipientes, pero la presente invención no se limita a ellos. Los ejemplos de preparación representativos se describieron del siguiente modo.

Preparación de inyección

20 Proteína DKK2 100 mg

Metabisulfito sódico 3,0 mg

Metilparabeno 0,8 mg

25 Propilparabeno 0,1 mg

Agua destilada para inyección cantidad óptima

30 La preparación para inyección se preparó disolviendo el componente activo, controlando el pH a aproximadamente 7,5 y después cargando todos los componentes en 2 ^{ampollos} y esterilizando por el método de preparación de inyección convencional.

Preparación de polvo

35 Proteína DKK2 500 mg

Almidón de maíz 100 mg

40 Lactosa 100 mg

Talco 10 mg

La preparación de polvo se preparó mezclando los componentes anteriores y cargando un envase sellado.

Preparación de comprimido

Proteína DKK2 200 mg

50 Almidón de maíz 100 mg

Lactosa 100 mg

Estearato de magnesio cantidad óptima

55 La preparación de comprimido se preparó mezclando los componentes anteriores y formando comprimidos.

Preparación de cápsula

60 Proteína DKK2 100 mg

Lactosa 50 mg

Almidón de maíz 50 mg

65 Talco 2 mg

Estearato de magnesio cantidad óptima

La preparación de comprimido se preparó mezclando los componentes anteriores y cargando una cápsula de gelatina por el método de preparación de gelatina convencional.

- 5 Preparación de líquido
Proteína DKK2 1000 mg
- 10 Azúcar 20 g
Polisacárido 20 g
Aroma de limón 20 g
- 15 La preparación líquida se preparó disolviendo el componente activo, y después cargando todos los componentes en 1000 ml y esterilizando por el método de preparación de líquido convencional.
- 20 Preparación de alimento saludable
Proteína DKK2 1000 mg
Mezcla de vitamina cantidad óptima
- 25 Acetato de vitamina A 70 mg
Vitamina E 1,0 mg
- 30 Vitamina B₁ 0,13 mg
Vitamina B₂ 0,15 mg
Vitamina B₆ 0,5 mg
- 35 Vitamina B₁₂ 0,2 mg
Vitamina C 10 mg
- 40 Biotina 10 mg
Amida del ácido nicotínico 1,7 mg
Ácido fólico 50 mg
- 45 Ácido pantoténico cálcico 0,5 mg
Mezcla de minerales cantidad óptima
- 50 Sulfato ferroso 1,75 mg
Óxido de zinc 0,82 mg
Carbonato de magnesio 25,3 mg
- 55 Fosfato monopotásico 15 mg
Fosfato dicálcico 55 mg
Citrato potásico 90 mg
- 60 Carbonato cálcico 100 mg
Cloruro de magnesio 24,8 mg
- 65 Las mezclas de vitaminas y minerales mencionadas anteriormente pueden variarse de muchos modos. Dichas variaciones no deben considerarse como una desviación del espíritu y alcance de la presente invención.

Preparación de bebida saludable

Proteína DKK2 1000 mg

5 Ácido cítrico 1000 mg

Oligosacárido 100 g

10 Concentrado de albaricoque 2 g

Taurina 1 g

Agua destilada 900

15 La preparación de bebida saludable se preparó disolviendo el componente activo, mezclando, agitando a 85°C durante 1 hora, filtrando y después cargando todos los componentes en 1000 amplio y esterilizando por el método de preparación de bebida saludable convencional.

Aplicabilidad industrial

20 Como se describe en la presente invención, la DKK2 mostró actividades estimuladoras de formación de conductos en HUVEC, actividad promotora del brote de tejidos del círculo arterial y actividad promotora del desarrollo vascular en los embriones de ratón. Por lo tanto, puede usarse como agente terapéutico o alimento saludable funcional para tratar y prevenir enfermedades isquémicas.

25

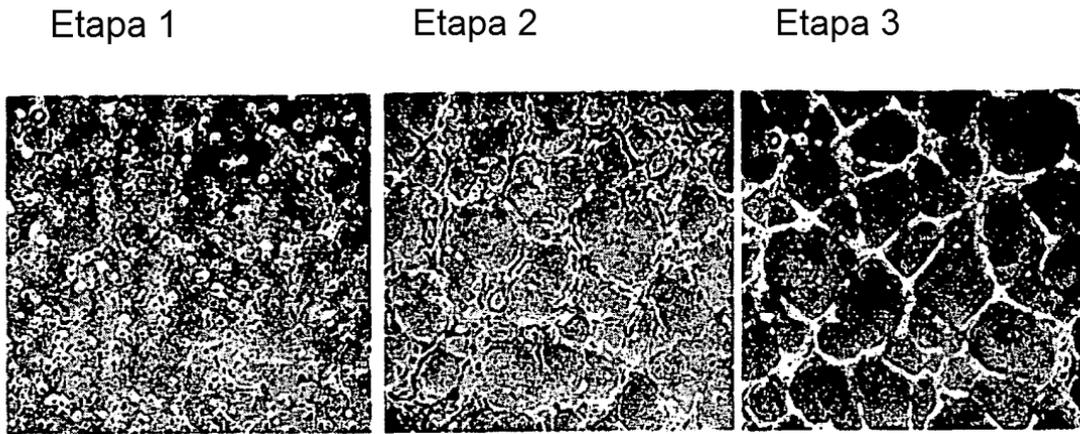
Lista de secuencias

30 La SEC ID N° 1 es la secuencia de aminoácidos de DKK2 humana, la SEC ID N° 2 es la secuencia de ADN de DKK2 humana, la SEC ID N° 3 es la secuencia de aminoácidos de DKK2 de ratón, la SEC ID N° 4 es la secuencia de ADN de DKK2 de ratón, la SEC ID N° 5 es la secuencia del cebador directo de DKK2 humana, la SEC ID N° 6 es la secuencia del cebador inverso de DKK2 humana, la SEC ID N° 7 es la secuencia del cebador directo de DKK2 de ratón, y la SEC ID N° 8 es la secuencia del cebador inverso de DKK2 de ratón.

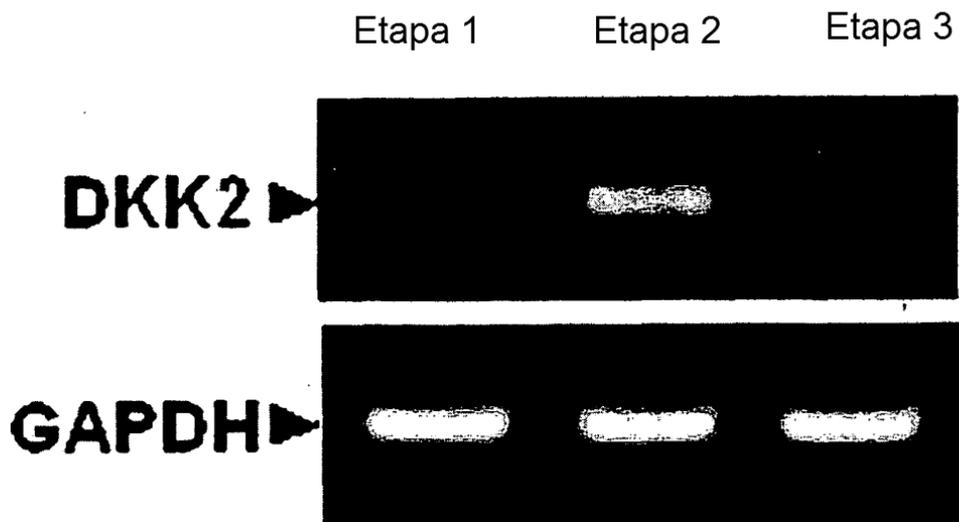
REIVINDICACIONES

- 5 1. Una cantidad eficaz de proteína DKK2 o el ADN que codifica la proteína DKK2 para su uso en la estimulación de la angiogénesis en un mamífero, **caracterizada por** su administración al tejido no formado vascular del mamífero, uso, donde dicho tejido no formado vascular es tejido dérmico, tejido muscular y tejido conectivo recién formado después de lesión causada por enfermedad isquémica.
- 10 2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha enfermedad isquémica es quemadura, psoriasis, úlcera, isquemia, infarto de miocardio, angina de pecho, infarto cerebral o hemorragia cerebral.
- 15 3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, done dicho ADN se administra usando un vector viral o un vector no viral.
4. El uso de acuerdo con la reivindicación 3, donde dicho vector viral es vector adenoviral, vector viral adeno-
15 asociado, vector retroviral, vector lentiviral o vector del virus del herpes simple.
5. El uso de acuerdo con la reivindicación 4, donde dicho vector no viral es el plásmido que puede expresarse en células animales.
- 20 6. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha proteína DKK2 está representada por la SEC ID N°
7. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho ADN está representado por la SEC ID N° 2.
- 25 8. Uso de la proteína DKK2 o el ADN que codifica la proteína DKK2 para la fabricación de medicinas para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedades isquémicas.
- 30 9. Una composición farmacéutica que comprende una proteína DKK2 o ADN que codifica la proteína DKK2 como ingrediente activo para su uso en el tratamiento y prevención de enfermedades isquémicas.
- 30 10. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9, donde dicha proteína DKK2 está representada por la SEC ID N° 1.
- 35 11. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9, donde dicho ADN está representado por la SEC ID N° 2.
12. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9, donde dicha enfermedad isquémica es quemadura, psoriasis, úlcera, isquemia, infarto de miocardio, angina de pecho, infarto cerebral o hemorragia cerebral.
- 40 13. Un alimento saludable que comprende una proteína DKK2 o el ADN que codifica la proteína DKK2 como ingrediente activo para su uso en la prevención o mejora de una enfermedad isquémica, donde dicho alimento saludable se proporciona preferiblemente en forma de píldora, polvo, gránulo, comprimido, comprimido masticable, cápsula o tipo bebida.

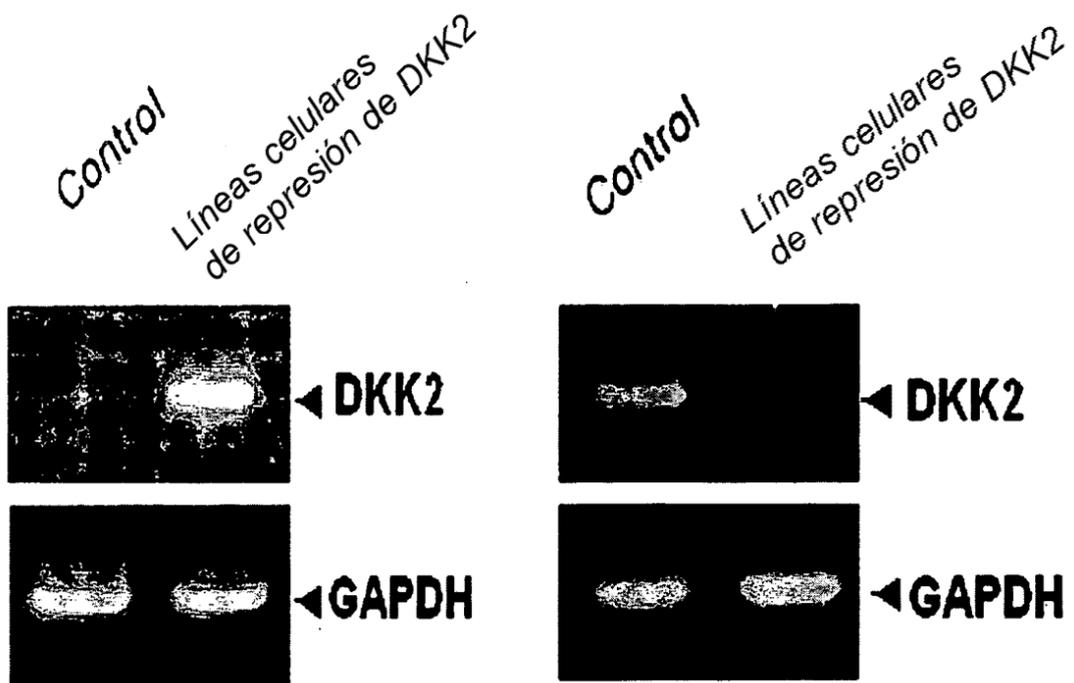
[Fig. 1]



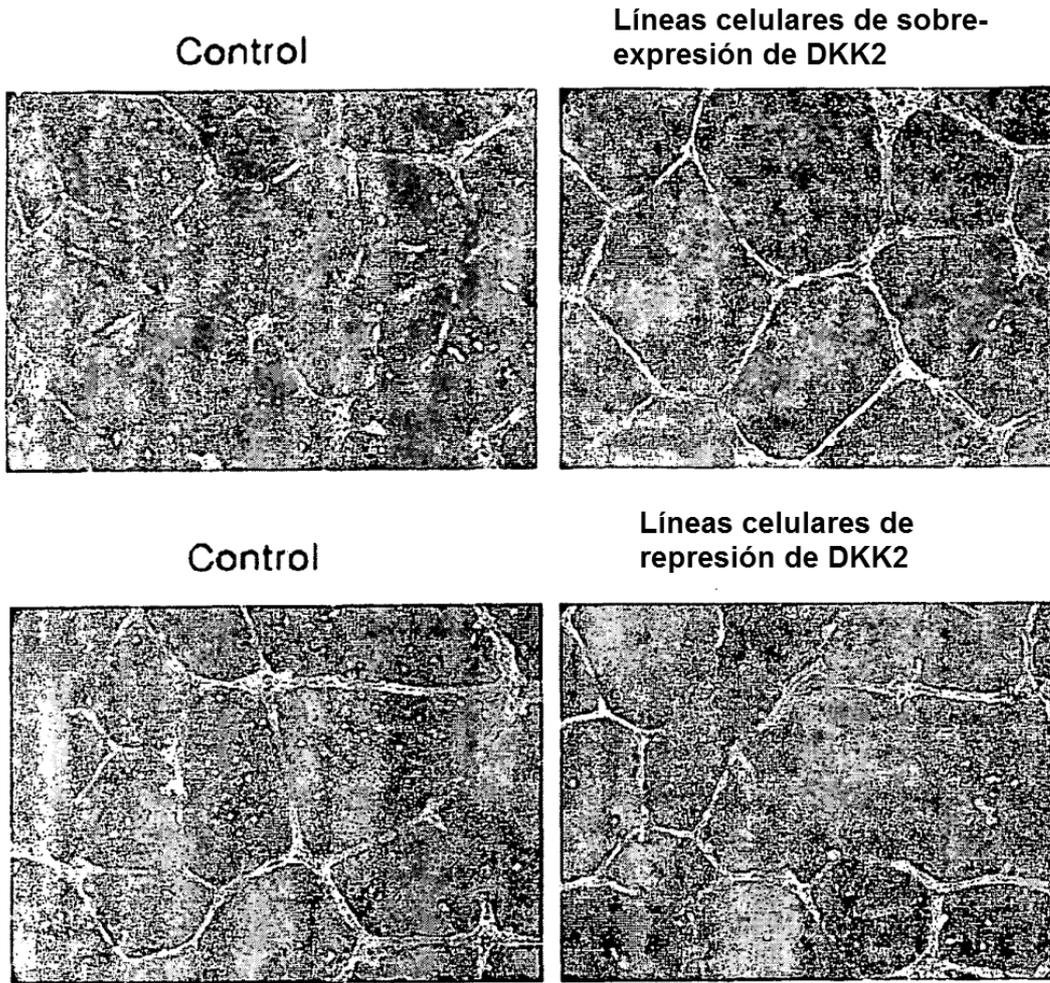
[Fig. 2]



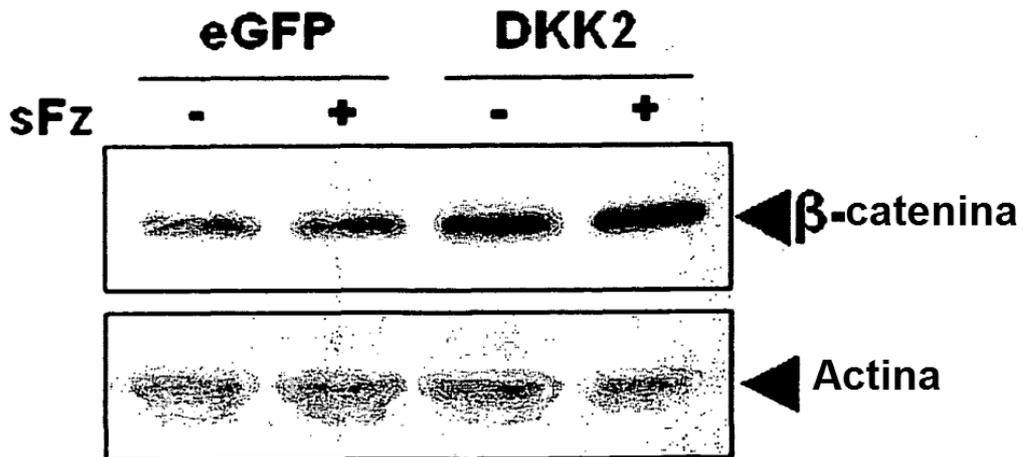
[Fig. 3]



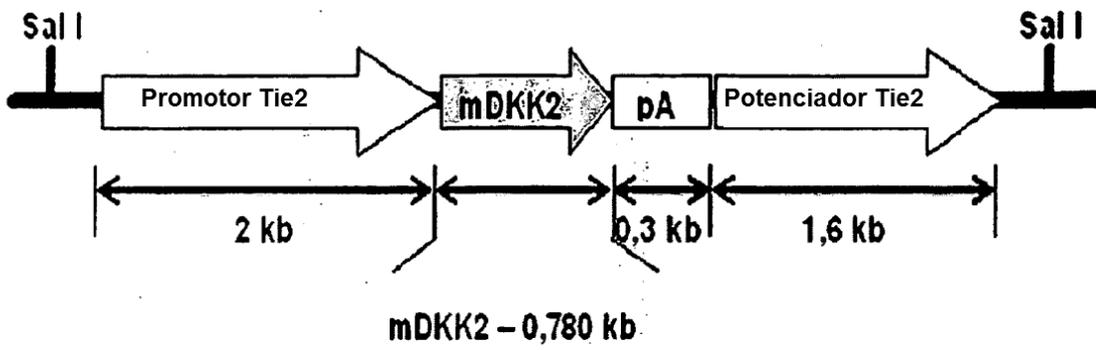
[Fig. 4]



[Fig. 5]

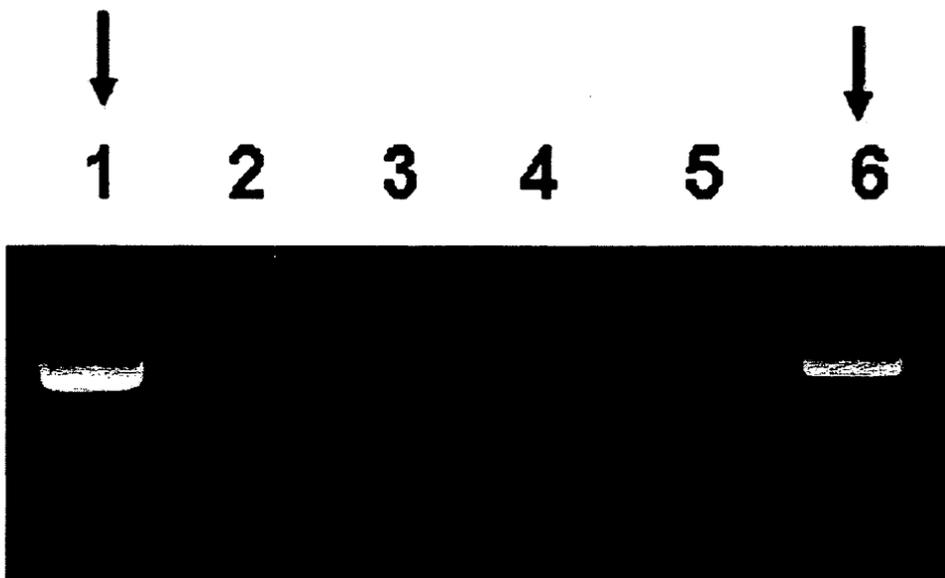


[Fig. 6]

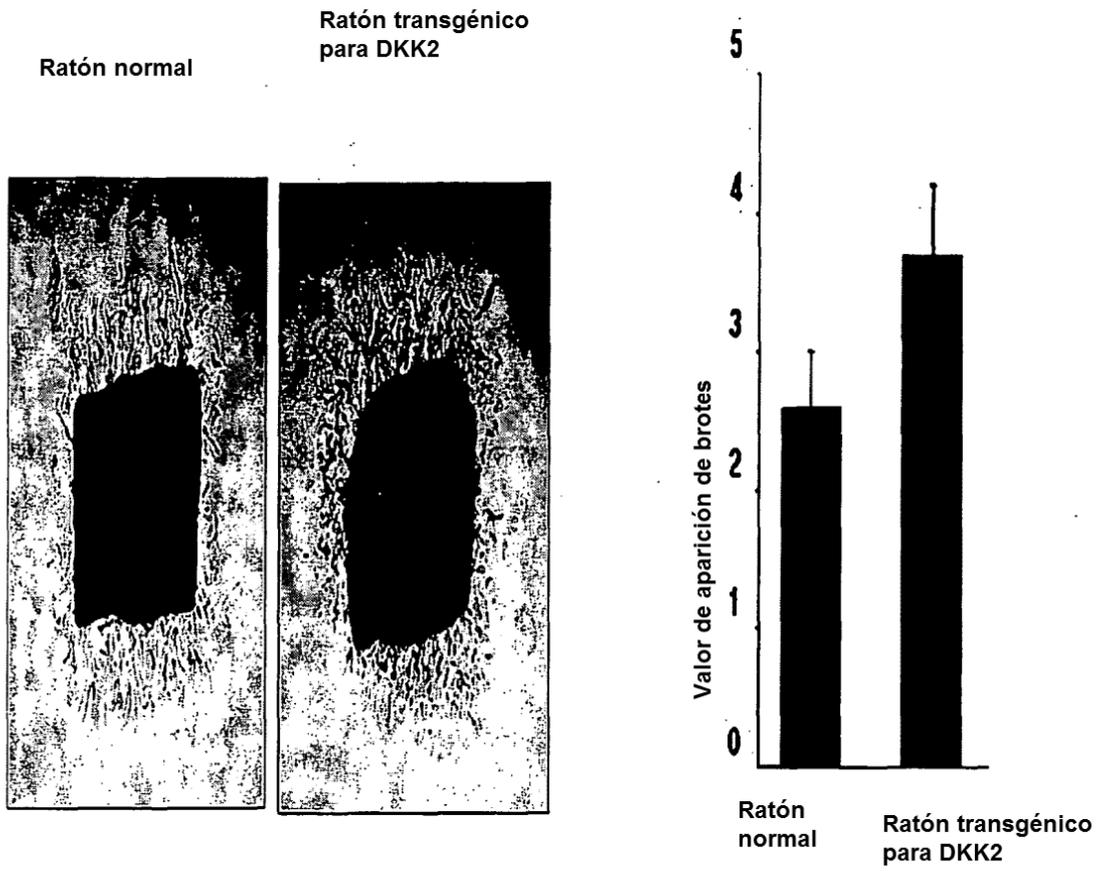


[Fig. 7]

Ratón transgénico para DKK2



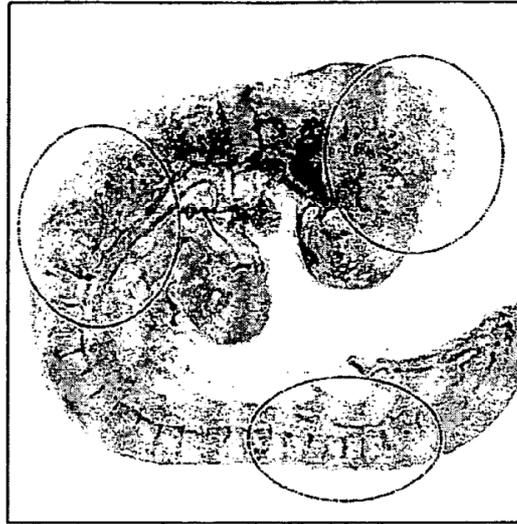
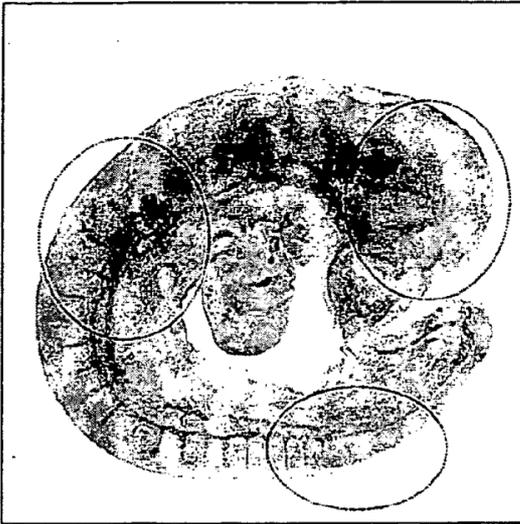
[Fig. 8]



[Fig. 9]

Ratón normal

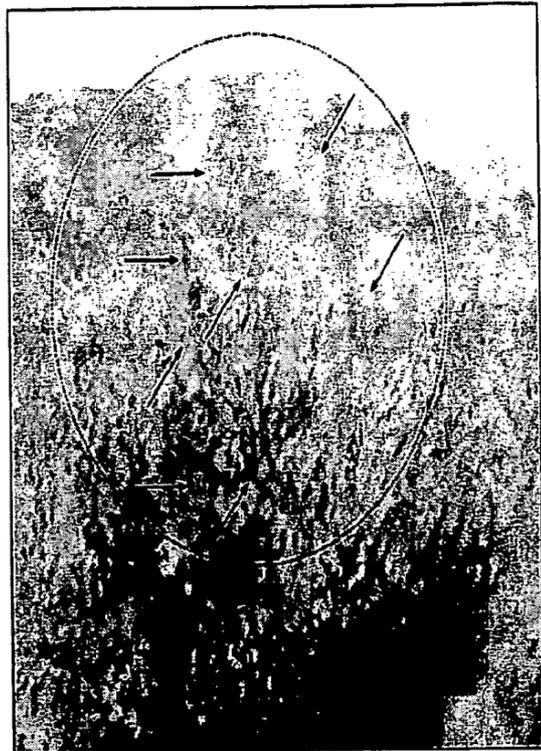
Ratón transgénico
para DKK2



[Fig. 10]

Ratón normal

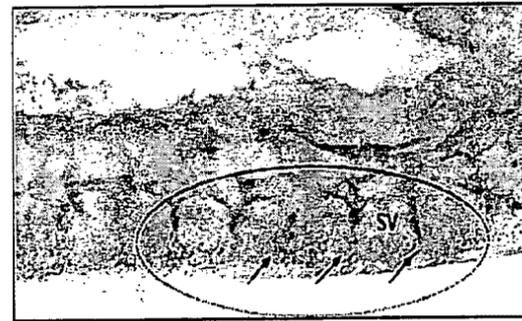
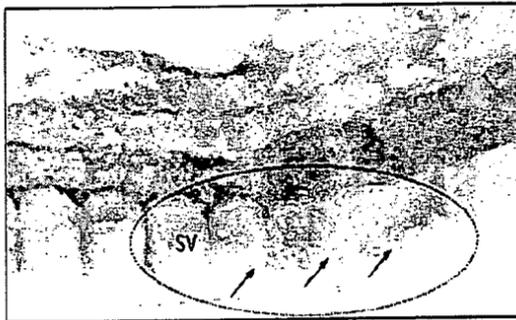
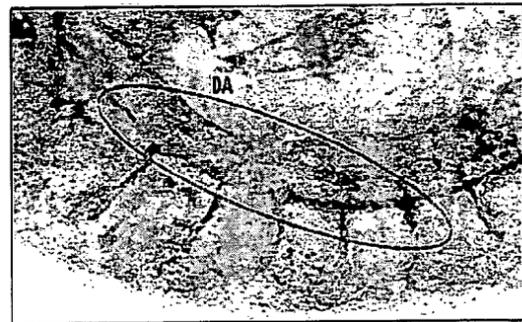
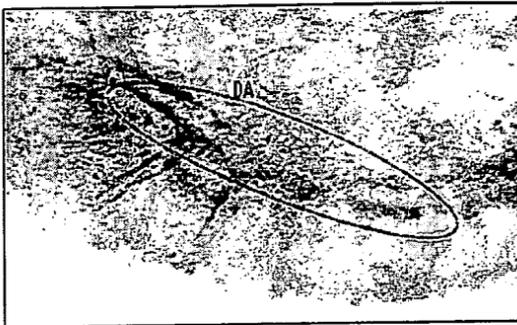
Ratón transgénico
para DKK2



[Fig. 11]

Ratón normal

Ratón transgénico
para DKK2



DA, aorta descendente
SV, vaso segmentario