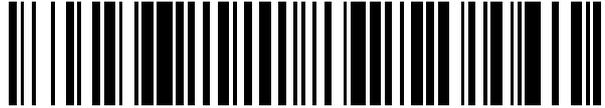


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 429 034**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2002 E 02782310 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2013 EP 1451578**

54 Título: **Uso de antagonistas de ANGPTL3 para el tratamiento de enfermedades hepáticas**

30 Prioridad:

16.11.2001 US 332429 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

12.11.2013

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO CALIFORNIA 94080-
4990, US**

72 Inventor/es:

**FERRARA, NAPOLEONE;
GERBER, HANS-PETER;
KOWALSKI, JOE;
PISABARRO, MARIA, TERESA y
SHERMAN, DANIEL, ERIC**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 429 034 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

Uso de antagonistas de ANGPTL3 para el tratamiento de enfermedades hepáticas.

5 Campo de la invención

[0001] La presente descripción se refiere a polipéptidos Angptl3, así como a procedimientos y medios para hacer y usar dichas moléculas de proteína, y a anticuerpos que se unen a los polipéptidos Angptl3.

10 Descripción de la técnica relacionada

[0002] El crecimiento de nuevos vasos sanguíneos es un requisito previo durante los procesos fisiológicos normales del desarrollo embrionario y posnatal. Dicha proliferación de nuevos vasos sanguíneos a partir de capilares preexistentes, un proceso denominado angiogénesis, tiene además una función clave en el desarrollo patológico de tumores sólidos, retinopatías diabéticas, psoriasis, inflamación y artritis reumatoide (Ferrara, *Recent Prog. Horm. Res.* 55:15-35 (2000), discusión 35-6).

[0003] La angiogénesis no solo depende de factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), sino que también le influyen las moléculas de adhesión celular (CAM), incluyendo integrinas. La inactivación de diferentes genes que codifican receptores de adhesión específicos o la administración de anticuerpos de bloqueo en modelos animales, tienen efectos profundos en la respuesta angiogénica de las células endoteliales (Elicieri y Cheresch, *Mol. Med.*, 4:741-50 (1998)).

[0004] La familia de proteínas de adhesión celular integrinas está compuesta de 15 subunidades α y 8 β que son expresadas en al menos 22 combinaciones heterodímeras $\alpha\beta$ diferentes (Byzova y col., *Mol. Cell.*, 6(4):851-60 (2000)). Entre estas, al menos seis ($\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$, $\alpha5\beta1$, $\alpha2\beta1$, $\alpha\beta1$ y $\alpha1\beta1$) de las combinaciones se han implicado en la angiogénesis (Hynes y Bader, *Thromb. Haemost.*, 78(1):83-7 (1997); Hynes y col., *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 32(5):501-10 (1999)). Las integrinas facilitan la adhesión celular a y la migración en las proteínas de la matriz extracelular encontradas en espacios intercelulares y membranas basales.

[0005] La integrina $\alpha\beta3$ es un receptor para una amplia variedad de proteínas de la matriz extracelular incluyendo vitronectina, fibronectina, fibrinógeno, laminina, colágeno, factor de Van Willebrand, osteopontina y un fragmento de MMP2 (PEX) entre otros (para una revisión véase Eliceiri y Cheresch, *Cancer J. Sci. Am.* 6 Suppl 3:S245-9 (2000)). A pesar de su comportamiento de unión a ligando promiscuo, $\alpha\beta3$ no es expresada ampliamente en tejidos de adultos, se encuentra en algunas células de músculo liso vascular, intestinal y uterino (Brem y col., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 35:3466-74 (1994)). Este receptor también es expresado en algunos leucocitos activados, en macrófagos y osteoclastos, donde tienen una función crucial durante la resorción ósea (McHugh, y col., *J. Clin. Invest.*, 105:433-40 (2000)). De forma más destacada, $\alpha\beta3$ está regulada en exceso en células endoteliales expuestas a hipoxia y citoquinas tales como el factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) (Suzuma y col., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39:1029-35 (1998); Walton y col., *J. Cell. Biochem.*, 78:674-80 (2000)). In vivo se observó la expresión aumentada de $\alpha\beta3$ en célula vasculares en tejidos de granulación tumoral, durante la curación de heridas, degeneración macular y otras enfermedades neovasculares. En una variedad de modelos in vitro e in vivo de angiogénesis tumoral, el bloqueo de $\alpha\beta3$ con anticuerpos monoclonales o antagonistas de ligando, conduce a la formación reducida de vasos sanguíneos (Brooks y col., *Cell* 79:1157-64 (1994); Eliceiri y Cheresch, *Mol. Med.* 4:741-50 (1998)).

[0006] Aunque hay un gran número de publicaciones que se centran en el mecanismo implicado en la regulación de la angiogénesis en afecciones patológica tales como el crecimiento tumoral o la formación de vasos colateral después de isquemia miocárdica, sorprendentemente se sabe poco sobre la función del proceso angiogénico durante la regeneración hepática. Después de hepatectomía parcial (PH), tanto los hepatocitos como las células no parenquimatosas expresaban ARNm del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Mochida y col. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 226:176-9 issn: 0006-291x (1996)), lo que implica que el VEGF, mediante la inducción de la angiogénesis, puede tener una función en la regeneración hepática. Sin embargo, los antisueros neutralizantes contra VEGF no alteran las tasas de recuperación después de lesión, pero conducen a una reducción de las células endoteliales y hepatocitos que proliferan, en este modelo (Taniguchi y col., *J. Histochem. Cytochem.* 49:121-30 (2001)). En apoyo de esto, la adición del inhibidor de la angiogénesis TNP-470 no perjudica curación de herida después de hepatectomía, sugiriendo que no es necesaria la angiogénesis sensible a TNP470 durante la regeneración hepática (Tanaka y col., *Br. J. Surg.*, 83(10):1444-7 (1996)). El documento WO00/53757A describe

Angptl3 entre otros polipéptidos y se refiere a agonistas y antagonistas del mismo en composiciones farmacéuticas para tratar trastornos cardiovasculares, endoteliales y angiogénicos.

[0007] Es necesario identificar nuevos factores que estén implicados en la regeneración hepática, y en particular en el proceso de angiogénesis durante la regeneración hepática.

Resumen de la invención

[0008] La presente invención se refiere a medios, como se define en las reivindicaciones, para tratar el daño tisular caracterizado por el exceso de expresión de Angptl3 por tratamiento del tejido con un antagonista de Angptl3 de SEQ ID NO: 2 o un homólogo de mamífero del mismo. En una realización, el tratamiento incluye la prevención y más específicamente la prevención del avance del daño tisular.

[0009] En una realización preferida, el tejido es tejido hepático humano. El antagonista es preferiblemente un antagonista de Angptl3 de SEQ ID NO: 2. El daño tisular está asociado con la inflamación. La inflamación preferiblemente está asociada con un enfermedad hepática crónica seleccionada del grupo que consiste en cirrosis hepática, fibrosis hepática, hepatitis crónica, hepatitis vírica A, B, C, D, E y G, daño hepático metabólico tóxico, hígado graso, lesión por isquemia-reperfusión del hígado y septicemia. La cirrosis hepática es cirrosis hepática alcohólica o cirrosis biliar primaria (CBP). La hepatitis se selecciona del grupo que consiste en hepatitis autoinmune crónica, hepatitis alcohólica crónica y esteatohepatitis no alcohólica (EHNA).

[0010] En otra realización, el antagonista es un anticuerpo dirigido contra Angptl3, un anticuerpo dirigido contra $\alpha\beta 3$ o una inmunoadhesina. El anticuerpo es preferiblemente un anticuerpo monoclonal, un fragmento de anticuerpo o un anticuerpo monocatenario, que se selecciona del grupo que consiste en fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$ y Fv. El anticuerpo monoclonal es preferiblemente quimérico, humanizado o humano. La inmunoadhesina comprende al menos la región de unión al ligando de $\alpha\beta 3$ fusionada con una secuencia de inmunoglobulina o comprende al menos la región de unión al receptor de Angptl3 usada contra una secuencia de inmunoglobulina.

[0011] En el presente documento se describe un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad hepática crónica en un sujeto mamífero, que comprende administrar a un sujeto mamífero que lo necesite, una cantidad eficaz de un antagonista de Angptl3 de SEQ ID NO: 2, o un homólogo de mamífero del mismo. En una realización, el sujeto mamífero es un ser humano. El tratamiento incluye la prevención, y más específicamente la prevención del avance de la enfermedad hepática. El antagonista administrado es un antagonista de Angptl3 de SEQ ID NO: 2 o un anticuerpo, en particular, un anticuerpo dirigido contra Angptl3 o un anticuerpo dirigido contra $\alpha\beta 3$. La enfermedad crónica del hígado se caracteriza por la expresión elevada de Angptl3. La enfermedad hepática se selecciona del grupo que consiste en cirrosis hepática, fibrosis hepática, hepatitis crónica, hepatitis vírica A, B, C, D, E y G, daño hepático metabólico tóxico, hígado graso, lesión por isquemia-reperfusión del hígado y septicemia.

[0012] En el presente documento se describe un procedimiento para tratar la enfermedad hepática aguda, que comprende administrar a un sujeto mamífero que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 80% con la secuencia de Angptl3 humano de SEQ ID NO: 2, o un agonista del mismo. En una realización, el sujeto mamífero es un ser humano. El tratamiento incluye la prevención y más específicamente la prevención del avance de la enfermedad hepática aguda. El polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 98% con la secuencia de Angptl3 humano de SEQ ID NO: 2 o un agonista del mismo. En una realización preferida, el polipéptido comprende las regiones de aminoácidos 281-293 (P1, SEQ ID NO: 14), 442-460 (P2, SEQ ID NO: 15), y 415-430 (P3, SEQ ID NO: 17) de la secuencia de Angptl3 humano de SEQ ID NO: 2. En una realización preferida más, el polipéptido comprende el dominio de fibrinógeno de la secuencia de Angptl3 humano de SEQ ID NO: 2. En una realización incluso más preferida, el procedimiento comprende administrar un agente terapéutico adicional. El agente terapéutico adicional es un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). El agonista es un anticuerpo agonista que se une específicamente a Angptl3 o $\alpha\beta 3$.

[0013] En todas las aplicaciones terapéuticas (incluyendo la prevención), el polipéptido Angptl3, o un agonista o un antagonista del mismo, se puede administrar en combinación con un agente terapéutico adicional, tal como un factor angiogénico adicional, p. ej., factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o factor de crecimiento de fibroblastos (FGF).

Breve descripción de los dibujos

[0014] La figura 1 es la secuencia de nucleótidos de Angptl3 (SEQ. ID NO: 1) (DNA 16451).

[0015] Las figuras 2A y 2B son la secuencia de aminoácidos de Angptl3 (SEQ. ID NO: 2).

5

[0016] La figura 3A es una comparación de la estructura del dominio de Angptl3 (SEQ. ID NO: 2) y la angiopoyetina-1 (ANG1) y la angiopoyetina-2 (ANG2).

[0017] La figura 3B muestra el resultado del análisis de FACS de célula HMVEC incubada con medio condicionado que contenía la versión marcada con epítipo gD de ANG2, ARP1, Angptl3 o medio de control.

10

[0018] La figura 4 muestra el resultado de experimentos de coinmunoprecipitación usando células 293 cotransfectadas con plásmidos que codifican la versión marcada con gD de ANG1, ANG2, ARP1, Angptl3 y receptor Tie1 o receptor Tie2, respectivamente. Los líquidos sobrenadantes se inmunoprecipitaron con anticuerpos contra Tie1 o Tie2 y las proteínas se resolvieron por SDS-PAGE y se transfirieron a membrana de PVDF, se incubaron con anticuerpos contra el marcador gD o los receptores Tie, respectivamente.

15

[0019] Las figuras 5A-C muestran el modelado de homología del dominio de fibrinógeno de Angptl3. (A) diagrama de cinta de la superposición de la estructura de rayos X del extremo C de la cadena γ del fibrinógeno humano (3FIB) en blanco, y la estructura modelada del dominio de tipo fibrinógeno de Angptl3 en verde. Las hélices alfa se muestran como cilindros y las cadenas beta como flechas. Las regiones que difieren en ambas estructuras están marcadas. (B) Diagrama de cinta de la estructura modelada del dominio de tipo fibrinógeno de Angptl3 en verde. Las regiones P1, P1 y P3 implicadas en $\alpha 5\beta 3$ están destacadas en amarillo. (C) Alineamiento de secuencias del extremo C de la cadena γ del fibrinógeno humano (3FIB) (SEQ ID NO: 27) y el dominio de tipo fibrinógeno de Angptl3 (SEQ ID NO: 28) y la angiopoyetina 1 humana (SEQ ID NO: 29), 2 (SEQ ID NO: 30) y 4 (SEQ ID NO: 31). Los restos hidrófilos y cargados se presentan en azul, y los restos aromáticos/hidrófobos en naranja. La secuencia consenso se muestra debajo del alineamiento; con las mutaciones hidrófilas/cargadas y aromáticas/hidrófobas marcadas como cuadrados azules y naranjas, respectivamente. Los restos que corresponden a los péptidos usados en el estudio de los autores de la invención están recuadrados en amarillo. La numeración corresponde a la estructura de rayos x de 3FIB.

20

[0020] Las figuras 6A-C presentan pruebas de que Angptl3 es una glicoproteína secretada. (A) Gel de SDS-poliacrilamida teñido con Coomassie de Angptl3 humano purificado por inmunoafinidad. (B) Gel de SDS-poliacrilamida teñido con plata de Angptl3 murino purificado por inmunoafinidad, de células CHO transfectadas de forma transitoria. (C) Comparación de los pesos moleculares de proteína Angptl3 recombinante con (+) o sin (-) tratamiento con PNGasa. El peso molecular predicho para Angptl3 marcado con gD es 60 kDa. La transferencia western se llevó a cabo usando un anticuerpo dirigido contra gD.

35

[0021] Las figuras 7A-E presentan el análisis funcional de los dominios implicados en la unión de células endoteliales por Angptl3 y la identificación de la integrina $\alpha v\beta 3$ como mediador de respuestas biológicas. (A) La adhesión de HMVEC se ensayó después de preincubación con combinaciones de los péptidos p1, p2 y p3 (100 μ M o 250 μ M total), control (NL6-PP2-scr, 250 μ M) o péptidos RGD o RGE (250 μ M antes de la estimulación con MA 200 nM durante 4 h. A la adhesión en presencia de PMA 200 nM y en ausencia de péptidos se le asignó el valor de 100%. (B) La adhesión de células 293 que expresan en exceso la integrina $\alpha 11\beta 3$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 1$ o $\alpha v\beta 5$, se ensayó en placas de microvaloración recubiertas con hAngptl3 o BSA 20 μ g/ml. Las células se dejaron adherir a 37°C y se cuantificaron después de 4 h. (C) Se recubrieron placas de 96 pocillos con cantidades crecientes de hAngptl3 a 4°C durante la noche, se bloqueo la unión no específica con BSA al 3% a 37°C durante 1 h y los pocillos se lavaron con PBS antes de cultivar en placa las células HMVEC. Los datos mostrados son medias y DT de tres experimentos separados. (D) Se preincubaron HMVEC con o sin anticuerpos de bloqueo 25 mg/ml dirigidos contra $\alpha 5\beta 1$ (JBS5), contra $\alpha v\beta 3$ (LM609), o contra $\alpha v\beta 5$ (P1F6) antes de la estimulación con PMA 200 nM. Como control negativo, se llevó a cabo la adhesión en presencia de EDTA 10 mM. (E) Migración de HMVEC no estimuladas o estimuladas con hAngptl3 (50 μ g/ml) en presencia o ausencia de anticuerpos de bloqueo dirigidos contra $\alpha v\beta 3$ (LM609), o contra $\alpha v\beta 5$ (P1F6) 25 μ g/ml durante 16 h.

45

50

[0022] Las figuras 8A-C muestran que Angptl3 es expresado en hepatocitos durante el desarrollo y es claramente regulado por aumento en la enfermedad hepática. (A) El análisis por transferencia Northern de Angptl3 se hizo usando transferencias de múltiples tejidos humanos (Clontech) y puso de manifiesto la expresión de Angptl3 en el hígado y el riñón. Cada banda contiene 2 μ g de ARN de grano (BR), corazón (HT), músculo esquelético (SM), colon

55

(CO), timo (TH), bazo (SP), riñón (KD), hígado (LI), intestino delgado (SI), placenta (PL), pulmón (LU), y leucocito de sangre periférica (PBL), de adulto. (B) La expresión de hAngptl3 es claramente regulada por aumento en hepatocitos en tejidos de cirrosis hepática después de daño tóxico con acetaminofeno. No se observaron alteraciones en una muestra de tumor hepático. (C) La hibridación in situ de hígado de ratón fetal mostró la expresión de Angptl3 en E15 y E18 en hepatocitos pero no en progenitores eritroides, células endoteliales y megacariocitos.

[0023] Las figuras 9A-E muestran los efectos de CCLF1 en la inducción de la angiogénesis in vivo en la córnea de rata. (A) Fotomicrografías montadas planas representativas de córneas de rata 6 días después de implante de gránulos de Hydron tratados con tampón (control), (B) Angptl3 murino (500 ng), (C) VEGF (100 ng), (D) Angptl3 murino (500 ng) y VEGF (100 ng). (E) Datos resumen de la respuesta angiogénica in vivo respecto al control, VEGF (100 ng), mAngptl3 (500 ng), mAngptl3 (500 ng) y combinaciones indicadas. Los datos se expresan como la media±DT, n=5 animales/grupo. p<0,005 comparado con el control (prueba de Mann-Whitney para valores no paramétricos).

[0024] Las figuras 10A-B muestran el efecto protector de Angptl3 murino en la toxicidad hepática inducida por CCl4 evaluado por los niveles en el suero de aspartato transferasa (AST) el día 7 después de infección adenovírica el día 0 y tratamiento con CCl4 el día 4. La figura 10A muestra niveles iguales de expresión el día 7 después de infección adenovírica el día 0 y tratamiento con CCl4 el día 4 de todas las construcciones ensayadas. La figura 10B muestra los niveles de AST en el suero de ratones el día 7 tratado con los vectores víricos indicados el día 0 y con CCl4 el día 4. (P<0,0001).

[0025] Las figuras 11A-B muestran un aumento de los niveles de AST en el suero después de la expresión prolongada de Angptl3 murino en hígados de ratones genéticamente intactos C57/B16. La figura 11A muestra los niveles de AST en el suero de ratones en diferentes tiempos de medición después del tratamiento con las construcciones víricas indicadas el día 0 y tratamiento con CCl4 el día 4. La figura 11B muestra un aumento de los niveles de ALT y AST en el suero de ratones que no expresan RAG2, 2 semanas después de infección adenovírica. Los resultados se muestran como medias±DT. El número de animales por grupo era 6. (P<0,0001).

[0026] Las figuras 12A-D muestran un aumento de la permeabilidad vascular en la piel de ratones transgénicos K5-Angptl3 o en ratones FVB genéticamente intactos, en respuesta a la administración intradérmica de vectores adenovíricos que expresan Angptl3. La figura 12A muestra los resultados del análisis por RT-PCR en tiempo real del ARN aislado de diferentes órganos de ratones transgénicos y de control genéticamente intactos de la camada correspondiente. La expresión transgénica en la piel alcanzó aproximadamente 10% de los niveles de expresión de Angptl3 endógenos que se detectaron en el hígado. La figura 12B muestra los resultados del análisis por RT-PCR en tiempo real del ARN aislado de biopsias de piel de ratones transgénicos y de control genéticamente intactos de la camada correspondiente en tiempos de medición posnatales diferentes. La figura 12C muestra los resultados del ensayo de azul de Evans que se realizó en ratones transgénicos y de control genéticamente intactos de la camada correspondiente de 11 semanas de edad, para determinar el nivel de permeabilidad vascular. Los ratones transgénicos presentaban un aumento significativo de la permeabilidad vascular en condiciones basales (paneles de la izquierda) pero no cuando se estimulaban con aceite de mostaza (panel derecho). La cantidad de colorante de azul de Evans extravasado se midió por espectrofotómetro óptico a 610 nm de absorción, y se expresó como el contenido de colorante por 1 mg de peso de tejido húmedo (panel inferior). Los resultados se muestran como medias±DT, y el número de animales por grupo era 6, P<0,05. La figura 12D muestra los resultados del ensayo con azul de Evans realizado 6 días después de administración a ratones FVB por inyección intradérmica de 1×10^9 ufp de la construcción adenovírica indicada. La piel de los ratones tratada con Angptl3 (p<0,05) o VEGF (p<0,005) presentó un aumento significativo de la permeabilidad vascular en condiciones basales (paneles de la izquierda) cuando se comparó con los ratones tratados con control (LacZ). Las cantidades de colorante de azul de Evans extravasado se midieron con un espectrofotómetro óptico a 610 nm, y se expresaron como el contenido de colorante por 1 mg de peso de tejido húmedo. Los resultados se muestran como medias±DT, y el número de animales por grupo era 6, P<0,05.

[0027] La figura 13 muestra el nivel de unión de hepatocitos murinos recién aislados a Angptl3 murino recombinante (mAngptl3). Adhesión de hepatocitos a discos de cultivo recubiertos con las concentraciones indicadas de mAngptl3 recombinante, fibronectina o control de BSA. La unión no específica se bloqueó con BSA al 3% a 37°C durante 1 h, y los pocillos se lavaron con PBS antes de cultivar las células. Los datos mostrados representan media±DT de un experimento representativo realizado por triplicado de un total de tres experimentos independientes.

Descripción detallada

A. Definiciones

[0028] La expresión "enfermedad hepática" se usa en el presente documento en el sentido más amplio y se refiere a cualquier enfermedad del hígado asociada con cualquier tipo de lesión hepática, independientemente de la causa subyacente. Por lo tanto, la enfermedad hepática puede ser resultado, por ejemplo, de procesos infecciosos o autoinmunitarios, de lesiones mecánicas o químicas al hígado, o de cáncer, todos los cuales están incluidos dentro de la definición de "enfermedad hepática". La lesión química al hígado puede ser causada por una variedad de toxinas, tales como alcohol, tetracloruro de carbono, tricloroetileno, sobredosis de hierro, sobredosis de fármaco, efectos secundarios de fármacos etc.

[0029] La expresión "daño tisular asociado con inflamación" y las variantes gramaticales de la misma, se usan para hacer referencia a cualquier daño tisular que resulte, al menos parcialmente, de inflamación o esté acompañado por una respuesta inflamatoria. El tejido puede, por ejemplo, ser tejido hepático, o tejido cardíaco, y el daño tisular puede, por ejemplo, estar asociado con una enfermedad hepática inflamatoria.

[0030] La expresión "enfermedad hepática inflamatoria" se usa en el presente documento para hacer referencia a cualquier enfermedad hepática, cuya patogénesis implica la activación y reclutamiento de células inflamatorias al hígado, independientemente de si la causa subyacente es un proceso infeccioso o autoinmunitario, lesión química al hígado u otros. Por lo tanto, las enfermedades hepáticas inflamatorias incluyen, sin limitación, hepatitis alcohólica y cirrosis, hepatitis vírica, lesión por isquemia-reperfusión del hígado, septicemia y cirrosis biliar primaria (CBP). Para una revisión, véase Lawson y col., *Toxicol. Sci.* 54:509-16 (2000).

[0031] La expresión "enfermedad hepática crónica" se usa en el presente documento para hacer referencia a enfermedades hepáticas caracterizadas por el exceso de expresión de Angptl3, e incluye, sin limitación, enfermedades inflamatorias del hígado y tumores hepáticos. Las enfermedades inflamatorias del hígado incluyen, por ejemplo, cirrosis, tal como, cirrosis de hígado alcohólico y cirrosis biliar primaria (PBC). fibrosis hepática, hepatitis crónica, es decir, hepatitis autoinmunitaria, hepatitis alcohólica crónica, esteatohepatitis no alcohólica (EHNA, también conocida como estatois), hepatitis vírica A, B, C, D, E y G, daño hepático metabólico tóxico, hígado graso, lesión por isquemia-reperfusión del hígado y septicemia. Los tumores hepáticos incluyen, por ejemplo, carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma y cáncer metastático del hígado.

[0032] La expresión "enfermedad hepática aguda" se usa en el presente documento para hacer referencia a una enfermedad hepática de corta duración, cuya evolución típicamente no supera 6 meses. Están incluidos en esta definición, por ejemplo, la hepatitis aguda, es decir, hepatitis autoinmunitaria aguda y hepatitis alcohólica aguda, e insuficiencia hepática aguda. Está específicamente incluida dentro de la definición cualquier enfermedad hepática de corta duración que no se caracteriza por el exceso de expresión de Angptl3.

[0033] "Hepatitis alcohólica", como se usa en el presente documento, incluye la hepatitis aguda y crónica que resulta del consumo excesivo de alcohol, y puede variar de una hepatitis leve, siendo las pruebas de laboratorio anómalas la única indicación de la enfermedad, a la disfunción hepática grave con complicaciones tales como ictericia (piel amarilla causada por la retención de bilirrubina), encefalopatía hepática (disfunción neurológica causada por insuficiencia hepática), ascitis (acumulación de fluido en el abdomen), varices esofágicas sangrantes (venas varicosas en el esófago), coagulación de la sangre anómala y coma.

[0034] La expresión "hepatitis vírica", como se usa en el presente documento, se refiere a la hepatitis que resulta de la infección por hepatitis A, B, C, D, E y G.

[0035] El virus de la hepatitis A (HAV) es un virus del grupo de los enterovirus de la familia de *Picornaviridae*, que normalmente produce una enfermedad leve caracterizada por la aparición repentina de fiebre, malestar, náuseas, anorexia, y malestar abdominal, seguido en varios días de ictericia.

[0036] El virus de la hepatitis B (HBV) es un virus de ADN principalmente bicatenario de la familia de *Hepadnaviridae*. El HBV produce hepatitis en el ser humano y los virus relacionados con esta familia producen hepatitis en patos, ardillas de tierra y marmotas. El genoma del HBV tiene cuatro genes pol, env, pre-core y X que codifican respectivamente la ADN polimerasa vírica, la proteína de la envuelta, la proteína pre-core (que es procesada en la cápsida vírica) y la proteína X. La función de la proteína X no está clara, pero puede estar implicada en la activación de genes de la célula hospedante y el desarrollo de cáncer. El HBV produce hepatitis aguda y crónica. Las posibilidades de convertirse en infectado crónico dependen de la edad. Aproximadamente 90% de los

neonatos infectados y 50% de los niños infectados se convierten en infectados crónicos. En contraste, solo aproximadamente de 5% a 10% de los adultos inmunocompetentes infectados por el HBV desarrollan la hepatitis B crónica.

5 **[0037]** El virus de la hepatitis C (HCV) es un virus de ARN monocatenario positivo, de la familia de *Flaviviridae*. El genoma tiene aproximadamente 10.000 nucleótidos y codifica una sola poliproteína de aproximadamente 3.000 aminoácidos. La poliproteína es procesada por la célula hospedante y proteasas víricas en tres proteínas estructurales principales y varias proteínas no estructurales necesarias para la replicación vírica. Se han identificado varios genotipos diferentes de HCV con secuencias genómicas ligeramente diferentes que se correlacionan con
10 diferencias en prognosis y respuesta al tratamiento. Aproximadamente 85% de los individuos con infección aguda por el HCV se convierten en infectados crónicos. Por lo tanto, el HCV es una causa principal de hepatitis crónica (que dura más de 6 meses). Una vez infectado crónicamente, el virus casi nunca se elimina sin tratamiento. En casos raros, la infección por el HCV produce enfermedad clínicamente aguda e incluso insuficiencia hepática, sin embargo, la mayoría de los casos de infección aguda son clínicamente indetectables.

15 **[0038]** El virus de la hepatitis D (HDV, también llamado virus delta) es un virus de ARN circular pequeño. El HDV es de replicación defectuosa y por lo tanto no puede propagarse en ausencia de otro virus. En los seres humanos, la infección por el HDV solo se produce en presencia de infección por el HBV.

20 **[0039]** El virus de la hepatitis E (HEV) normalmente produce hepatitis que es clínicamente indistinguible de la hepatitis A. Los síntomas incluyen malestar, anorexia, dolor abdominal, artralgia y fiebre. La hepatitis E se produce tanto de forma epidémica como endémica esporádica, normalmente asociada con agua potable contaminada.

[0040] El virus de la hepatitis G (HGV) es un flavivirus recién descubierto, relacionado con pero distinto del HCV, que puede producir hepatitis aguda y crónica.

[0041] La lesión por isquemia-reperfusión ocurre cuando el flujo de sangre a una región del cuerpo se detiene temporalmente (isquemia) y después se restablece (reperfusión). Las expresiones "lesión por isquemia-reperfusión" y "lesión isquémica-reperfusión" que se usan de forma intercambiable, se refieren al daño inicial asociado con la
30 privación de oxígeno a una célula y el posterior daño asociado con la respuesta inflamatoria cuando se vuelve a suministrar oxígeno a la célula. La lesión por isquemia-reperfusión puede ocurrir durante determinados procedimientos quirúrgicos, tales como reparación de algunos aneurismas aórticos y trasplante de órganos. La lesión puede ocurrir en partes del cuerpo en las que se ha interrumpido el suministro de sangre, o puede ocurrir en partes con suministro completo de sangre durante el periodo de isquemia. La lesión por isquemia-reperfusión en el
35 hígado puede ser resultado, por ejemplo, de resecciones quirúrgicas hepáticas y biliares, y clínicamente se manifiesta por complicaciones tales como disfunción hepática incluyendo daño hepatocelular y necrosis.

[0042] La "cirrosis biliar primaria (CBP)" es una enfermedad caracterizada por la destrucción inflamatoria de los pequeños conductos biliares dentro del hígado. La PBC finalmente conduce a la cirrosis del hígado. La etiología de la PBC no se entiende del todo, pero debido a la presencia de autoanticuerpos, en general se cree que es una enfermedad autoinmunitaria, sin embargo, otras etiologías tales como agentes infecciosos no se han excluido completamente. Aproximadamente 90% de los pacientes diagnosticados de PBC son mujeres, lo más común entre
40 edades de 40 a 60 años.

45 **[0043]** La "septicemia" es el resultado de infección bacteriana que se puede originar en cualquier parte del cuerpo, incluyendo el hígado o las vías biliares. La septicemia puede ser una situación potencialmente mortal, en especial en personas con un sistema inmunitario debilitado.

[0044] El término "angiogénesis", como se usa en el presente documento, se refiere al proceso por el cual surgen
50 nuevos vasos sanguíneos de la vasculatura existente y requiere tanto proliferación como motilidad de las células endoteliales para avanzar.

[0045] El término "cirrosis" se usa en el presente documento para hacer referencia a una afección hepática patológica caracterizada anatómicamente por nódulos ampliamente extendidos en el hígado combinado con fibrosis.
55 La cirrosis es la ruta común final para la mayoría de los tipos de enfermedades hepáticas crónicas, incluyendo las asociadas con el abuso de alcohol crónico, hepatitis vírica crónica, enfermedades metabólicas y biliares.

[0046] Las expresiones "polipéptido Angptl3", "proteína Angptl3" y "Angptl3" se usan de forma intercambiable, y abarcan la secuencia natural de Angptl3 y variantes del polipéptido Angptl3 (que se definen más en el presente

documento). El polipéptido Angptl3 se puede aislar de una variedad de fuentes, tal como de tipos de tejido humano o de otras fuentes, o se puede preparar por procedimientos recombinantes y/o sintéticos. Hay que indicar que Angptl3 se denominaba anteriormente "FLS139," "NL6," o "CCFL1". Por consiguiente, cualquier mención a Angptl3 debe leerse también como que se refiere a FLS139, NL6 y CCFL1.

5

[0047] Una "secuencia natural de Angptl3" o "Angptl3 natural" comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que la molécula de Angptl3 obtenida de la naturaleza. Dicha secuencia natural de Angptl3 se puede aislar de la naturaleza o se puede producir por medios recombinantes y/o sintéticos. La expresión "secuencia natural de Angptl3" o "Angptl3 natural" abarca específicamente formas secretadas o truncadas que se encuentran de forma natural (p. ej., una secuencia del dominio extracelular), formas variantes que se encuentran de forma natural (p. ej., formas empalmadas de forma alternativa) y variantes alélicas de Angptl3 que se encuentran de forma natural. En una realización de la invención, la secuencia natural de Angptl3 es una secuencia natural de Angptl3 natural madura o de longitud completa, que comprende los aminoácidos 1 a 460 de SEQ ID NO: 2. Aunque se muestra que el polipéptido Angptl3 de SEQ ID NO: 2 empieza con el resto de metionina designado en el presente documento como la posición de aminoácido 1, se puede imaginar y es posible que otro resto de metionina situado en la dirección 5' o en la dirección 3' de la posición del aminoácido 1 en la SEQ ID NO: 2 se pueda usar como el resto de aminoácido inicial para el polipéptido Angptl3. Además, las expresiones "secuencia natural de Angptl3" y "Angptl3 natural" incluyen específicamente el polipéptido sin la metionina de inicio.

[0048] La "variante de Angptl3" o "polipéptido variante de Angptl3", cuyas expresiones se usan de forma intercambiable, significa un polipéptido Angptl3 activo como se define más adelante, que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 80% con la secuencia de aminoácidos de (a) los restos 1 a 460 del polipéptido Angptl3 de SEQ ID NO: 2, o un homólogo de mamífero no humano del mismo, o (b) otro fragmento específicamente derivado de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o un homólogo de mamífero no humano del mismo. Dichos polipéptidos variantes de Angptl3 incluyen, por ejemplo, polipéptidos Angptl3 en los que se añaden o eliminan uno o más restos de aminoácidos en el extremo N y/o C, así como en uno o más dominios internos de la SEQ ID NO: 2. Normalmente, un polipéptido variante de Angptl3 tendrá una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos 80%, más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 83%, más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 84%, más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 85%, más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 86%, más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 88%, más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 89%, más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 90%, más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 91%, más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 92%, más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 93%, más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 94%, más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 95%, más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 96%, más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 97%, más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 98% y todavía más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 99%, con los restos 1 a 460 del polipéptido Angptl3 de SEQ ID NO: 2, o un homólogo de mamífero no humano del mismo. Los polipéptidos variantes de Angptl3 no abarcan una secuencia del polipéptido Angptl3 natural. Normalmente, los polipéptidos variantes de Angptl3 tienen al menos aproximadamente 10 aminoácidos de longitud, a menudo al menos aproximadamente 20 aminoácidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 30 aminoácidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 40 aminoácidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 60 aminoácidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 70 aminoácidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 80 aminoácidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 90 aminoácidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 150 aminoácidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 200 aminoácidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 250 aminoácidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 300 aminoácidos de longitud, o más. Las variantes de Angptl3 preferidas retienen al menos una de las regiones de aminoácidos 281 a 293, 415 a 430, y 442-460 de la secuencia natural humana de Angptl3 de SEQ ID NO: 2, o la o las regiones correspondientes de un homólogo de Angptl3 de mamífero no humano, o contiene solo sustituciones de aminoácidos conservativas dentro de dichas regiones.

[0049] La expresión "dominio de fibrinógeno" o "dominio similar a fibrinógeno" se usa para hacer referencia a los aminoácidos desde aproximadamente la posición 238 a aproximadamente la posición 460 de la secuencia de aminoácidos de Angptl3 (SEQ ID NO: 2).

5 **[0050]** El "porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos" con respecto a las secuencias de polipéptido Angptl3 identificadas en el presente documento, se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos de la secuencia de Angptl3, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje de identidad de secuencia máximo, y no considerando ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento con el
10 propósito de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede lograr de diferentes formas que se basan en la experiencia en la materia, por ejemplo, usando software de ordenador a disposición del público tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros adecuados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr el alineamiento máximo a lo largo de toda la longitud de las secuencias que se están comparando. Sin
15 embargo, para los propósitos del presente documento, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos se obtienen como se describe más adelante usando el programa de ordenador de comparación de secuencias ALIGN-2, en el que el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en las figuras 4A-Q. El programa de ordenador de comparación de secuencias ALIGN-2 fue autorizado por Genentech, Inc. y el código fuente mostrado en las figuras 4A-Q se ha presentado con la documentación de usuario en la U.S. Copyright Office,
20 Washington D.C., 20559, donde está registrado con el número de registro de Copyright de EE.UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está a disposición del público a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o se puede compilar a partir del código fuente proporcionado en las figuras 4A-Q. El programa ALIGN-2 debe compilarse para usar en un sistema operativo UNIX, preferiblemente digital UNIX V4.0D. Todos los parámetros de comparación de secuencias están fijados por el programa ALIGN-2 y no varían.

25 **[0051]** Para los propósitos del presente documento, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada respecto a, con, o frente a una secuencia de aminoácidos B dada (que alternativamente se puede expresar como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos respecto a, con, o frente a una secuencia de aminoácidos
30 B dada) se calcula como sigue:

[0052] 100 por la fracción X/Y

35 **[0053]** donde X es el número de restos de aminoácidos que se han puntuado como correspondencias idénticas por el programa de alineamiento de secuencias ALIGN-2 en el alineamiento de A y B de este programa, donde Y es el número total de restos de aminoácidos en B. Se observará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de A respecto a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B respecto a A.

40 **[0054]** Salvo que se indique otra cosa, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se ha descrito antes usando el programa de ordenador de comparación de secuencias ALIGN-2. Sin embargo, el % de identidad de secuencia de aminoácidos también se puede determinar usando el programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 (Altschul y col., *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 (1997)). El programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 se puede descargar de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. NCBI-BLAST2 usa varios parámetros de búsqueda, en el que todos esos parámetros de búsqueda se fijan a valores por defecto, incluyendo, por ejemplo, no oculto = si, cadena = todas, sucesos esperados = 10, longitud de complejidad bajo mínimo = 15/5, valor e multipasos = 0,01, constante para multipasos = 25, disminución por
45 alineamiento final con huecos = 25 y matriz de puntuación = BLOSUM62.

50 **[0055]** En las situaciones en las que se usa NCBI-BLAST2 para las comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada respecto a, con, o frente a una secuencia de aminoácidos B dada (que alternativamente se puede expresar como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos respecto a, con, o frente a una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula como sigue:

55 **[0056]** 100 por la fracción X/Y

[0057] donde X es el número de restos de aminoácidos que se han puntuado como correspondencias idénticas por el programa de alineamiento de secuencias NCBI-BLAST2 en el alineamiento de A y B de este programa, y

donde Y es el número total de restos de aminoácidos en B. Se observará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de A respecto a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B respecto a A.

5 **[0058]** "Secuencia de ácido nucleico variante de Angptl3" significa una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido Angptl3 activo como se define más adelante y que tiene una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 80% con (a) una secuencia de ácido nucleico que codifica los restos 1 a 460 de la secuencia de aminoácidos de Angptl3 SEQ ID NO: 2, o un homólogo de mamífero no humano de la misma, o (b) una secuencia de ácido nucleico que codifica otro fragmento específicamente derivado de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o un homólogo de mamífero no humano del mismo. Generalmente, un polinucleótido variante de Angptl3 tendrá una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 80%, más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 81%, más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 82%, más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 83%, más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 84%, más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 85%, más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 86%, más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 87%, más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 88%, más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 89%, más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 90%, más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 91%, más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 92%, más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 93%, más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 94%, más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 95%, más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 96%, más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 97%, más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 98% y todavía más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 99% con (a) una secuencia de ácido nucleico que codifica los restos 1 a 460 de SEQ ID NO: 2, o un homólogo de mamífero no humano de dicho polipéptido humano.

35 **[0059]** Generalmente, las secuencias de ácido nucleico variantes de Angptl3 tienen al menos aproximadamente 30 nucleótidos de longitud, a menudo al menos aproximadamente 60 nucleótidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 90 nucleótidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 120 nucleótidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 150 nucleótidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 180 nucleótidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 210 nucleótidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 240 nucleótidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 270 nucleótidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 300 nucleótidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 450 nucleótidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 600 nucleótidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 900 nucleótidos de longitud, o más.

45 **[0060]** El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de ácido nucleico" con respecto a las secuencias de ácido nucleico que codifican el polipéptido Angptl3 identificadas en el presente documento, se define como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos a los nucleótidos de la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido Angptl3, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje de identidad de secuencia máximo. El alineamiento con el propósito de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de ácidos nucleicos se puede lograr de diferentes formas que se basan en la experiencia en la materia, por ejemplo, usando software de ordenador a disposición del público tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros adecuados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr el alineamiento máximo a lo largo de toda la longitud de las secuencias que se están comparando. Sin embargo, para los propósitos del presente documento, los valores de % de identidad de secuencia de ácido nucleico se obtienen como se describe más adelante usando el programa de ordenador de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa de ordenador de comparación de secuencias ALIGN-2 fue autorizado por Genentech, Inc. y el código fuente se ha presentado con la documentación de usuario en la U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, donde está registrado con el número de registro de Copyright de EE.UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está a disposición del público a

través de Genentech, Inc., South San Francisco, California. El programa ALIGN-2 debe compilarse para usar en un sistema operativo UNIX, preferiblemente digital UNIX V4.0D. Todos los parámetros de comparación de secuencias están fijados por el programa ALIGN-2 y no varían.

5 **[0061]** Para los propósitos del presente documento, el % de identidad de secuencia de ácido nucleico de una secuencia de ácido nucleico C dada respecto a, con, o frente a una secuencia de ácido nucleico D dada (que alternativamente se puede expresar como una secuencia de ácido nucleico C dada que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos respecto a, con, o frente a una secuencia de ácido nucleico D dada) se calcula como sigue:

10

[0062] 100 por la fracción W/Z

[0063] donde W es el número de nucleótidos que se han puntuado como correspondencias idénticas por el programa de alineamiento de secuencias ALIGN-2 en el alineamiento de C y D de este programa, y donde Z es el número total de nucleótidos en D . Se observará que cuando la longitud de la secuencia de nucleótidos C no es igual a la longitud de la secuencia de nucleótidos D , el % de identidad de secuencia de ácido nucleico C respecto a D no será igual al % de identidad de secuencia de ácido nucleico de D respecto a C .

15

[0064] Salvo que se indique otra cosa específicamente, todos los valores de % de identidad de secuencia de ácido nucleico usados en el presente documento se obtienen como se ha descrito antes usando el programa de ordenador de comparación de secuencias ALIGN-2. Sin embargo, el % de identidad de secuencia de ácido nucleico también se puede determinar usando el programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 (Altschul y col., *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 (1997)). El programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 se puede descargar de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. NCBI-BLAST2 usa varios parámetros de búsqueda, en el que todos esos parámetros de búsqueda se fijan a valores por defecto, incluyendo, por ejemplo, no oculto = si, cadena = todas, sucesos esperados = 10, longitud de complejidad bajo mínimo = 15/5, valor e multipasos = 0,01, constante para multipasos = 25, disminución por alineamiento final con huecos = 25 y matriz de puntuación = BLOSUM62.

20

25

[0065] En los casos en los que se usa NCBI-BLAST2 para comparaciones de secuencias, el % de identidad de secuencia de ácido nucleico de una secuencia de ácido nucleico C dada respecto a, con, o frente a una secuencia de ácido nucleico D dada (que alternativamente se puede expresar como una secuencia de ácido nucleico C dada que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos respecto a, con, o frente a una secuencia de ácido nucleico D dada) se calcula como sigue:

30

35 **[0066]** 100 por la fracción W/Z

[0067] donde W es el número de nucleótidos que se han puntuado como correspondencias idénticas por el programa de alineamiento de secuencias NCBI-BLAST2 en el alineamiento de C y D de este programa, y donde Z es el número total de nucleótidos en D . Se observará que cuando la longitud de la secuencia de ácido nucleico C no es igual a la longitud de la secuencia de ácido nucleico D , el % de identidad de secuencia de ácido nucleico C respecto a D no será igual al % de identidad de secuencia de ácido nucleico de D respecto a C .

40

[0068] En otras realizaciones, los polinucleótidos variantes de Angptl3 son moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido Angptl3 activo, que son capaces de hibridar, preferiblemente en condiciones de hibridación y lavado restrictivas, con secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido Angptl3 de longitud completa de SEQ ID NO: 2. Los polipéptidos variantes de Angptl3 pueden ser los que son codificados por un polinucleótido variante de Angptl3.

45

[0069] El término "positivos", en el contexto de comparaciones de identidad de secuencias de aminoácidos realizadas como se ha descrito antes, incluye restos de aminoácidos en las secuencias comparadas que no solo son idénticas, sino que también tienen propiedades similares. Los restos de aminoácidos que se puntúan con un valor positivo respecto a un resto de aminoácido de interés, son aquellos que son idénticos al resto de aminoácido de interés o son una sustitución preferida del resto de aminoácido de interés.

50

[0070] Para los propósitos del presente documento, el valor de % de positivos de una secuencia de aminoácidos A dada respecto a, con, o frente a una secuencia de aminoácidos B dada (que alternativamente se puede expresar como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o comprende un determinado % de positivos respecto a, con, o frente a una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula como sigue:

55

[0071] 100 por la fracción X/Y

[0072] donde X es el número de restos de aminoácidos que se han puntuado como un valor positivo como se ha definido antes por el programa de alineamiento de secuencias ALIGN-2 en el alineamiento de A y B de este programa, donde Y es el número total de restos de aminoácidos en B. Se observará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de positivos de A respecto a B no será igual al % de positivos de B respecto a A.

[0073] El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente, por ejemplo, anticuerpos monoclonales dirigidos contra Angptl3 individuales (incluyendo agonistas, antagonistas y anticuerpos neutralizantes), composiciones de anticuerpos dirigidos contra Angptl3 con especificidad poliepitópica, anticuerpos dirigidos contra Angptl3 monocatenarios, y fragmentos de anticuerpos dirigidos contra Angptl3 (véase más adelante). La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homólogos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones que ocurren de forma natural que pueden estar presentes en cantidades minoritarias.

[0074] La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homólogos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones que ocurren de forma natural que pueden estar presentes en cantidades minoritarias.

[0075] Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una parte de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región de unión al antígeno o variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; fragmentos bivalentes; anticuerpos lineales (Zapata y col., *Protein Eng.*, 8(10):1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpo monocatenarias; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

[0076] La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión al antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un solo sitio de unión al antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar rápidamente. El tratamiento con pepsina de un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación de antígeno y todavía es capaz de entrecruzamiento del antígeno.

[0077] "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo, que contiene un sitio de unión y reconocimiento completo del antígeno. Esta región consiste en un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera, en estrecha asociación no covalente. Es en esta configuración en la que las tres CDR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L. Colectivamente, las seis CDR confieren especificidad de unión del antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión entero.

[0078] El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab difieren de los fragmentos Fab' por la adición de algunos restos en el extremo carboxi del dominio CH1 de la cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para Fab' en el que el o los restos de cisteína de los dominios constantes llevan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ originalmente se han producido como parejas de fragmentos Fab' que tienen las cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

[0079] Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie vertebrada se pueden asignar a uno o dos tipos claramente distintos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), basado en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

[0080] Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases. Hay 5 clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varias de estas se pueden dividir en subclases (isotipos), p. ej. IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a tres clases diferentes de inmunoglobulinas se llaman μ , δ , ϵ , y γ , respectivamente. Las estructuras de subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

- [0081]** El término "fragmento bivalente" se refiere a fragmentos de anticuerpos pequeños con dos sitios de unión al antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena de polipéptido (V_H-V_L). Usando un conector que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno. Los fragmentos bivalentes se describen de forma más completa, por ejemplo, en los documentos EP 404,097; WO 93/11161; y Hollinger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).
- 10 **[0082]** Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos de diagnóstico o terapéutico de los anticuerpos, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) a más de 95% en peso del anticuerpo, determinado por el procedimiento de Lowry, y lo más preferiblemente a más de 99% en peso, (2) a un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna usando un secuenciador de copa de centrifuga, o (3) hasta homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras usando tinción con azul de Coomassie, o preferiblemente con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ dentro de células recombinantes, puesto que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Sin embargo, generalmente, el anticuerpo aislado se preparará por al menos una etapa de purificación.
- 15 **[0083]** El término "variable" se refiere al hecho de que determinadas porciones de los dominios variables difieren extensamente en secuencia entre los anticuerpos y se usan en la especificidad de unión de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está uniformemente distribuida a lo largo de todos los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos llamados regiones determinantes de la complementariedad (CDR) o regiones hipervariables tanto en los dominios variables de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se llaman las regiones armazón (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera naturales comprenden cada uno 4 regiones FR que en líneas generales adoptan una configuración de lámina β conectada por tres CDR, que forma bucles que conectan, y en algunos casos que forman parte de, la estructura de lámina β . Las CDR en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las regiones FR, y con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (véase, Kabat y col., NIH Publ. No. 91-3242, Vol. I, páginas 647-669 (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diferentes funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo.
- 25 **[0084]** La expresión "región hipervariable" cuando se usa en el presente documento, se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende restos de aminoácidos de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR" (es decir, los restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD. [1991]) y/o los restos de un "bucle hipervariable" (es decir, los restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Clothia y Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 [1987]).
- 30 Los restos de la "región armazón" o "FR" son los restos del dominio variable distintos de la región hipervariable como se define en el presente documento.
- 35 **[0085]** Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (p. ej., murino) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión al antígeno de anticuerpos) que contienen la secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no humana. En la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una CDR del receptor se sustituyen por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata o conejo, que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos los restos Fv de FR de la inmunoglobulina humana se sustituyen por restos correspondientes no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en la CDR o secuencias de la región armazón importadas. Estas modificaciones se hacen para refinar y maximizar el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos un, y típicamente dos, dominios variables, en el que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una

secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado de forma óptima también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase, Jones y col., *Nature*, 321:522-525 (1986); Reichmann y co., *Nature*, 332: 323-329 [1988]; y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992). El anticuerpo humanizado incluye un anticuerpo PRIMATIZED™ en el que la región de unión al antígeno del anticuerpo se obtiene de un anticuerpo producido por inmunización de macacos con el antígeno de interés.

[0086] Como se usa en el presente documento, el término "inmuno adhesina" designa moléculas de tipo anticuerpo que combinan la especificidad de la unión de una proteína heteróloga ("adhesina") con las funciones efectoras de los dominios constantes de la inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmuno adhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es distinta que el reconocimiento de antígeno y el sitio de unión de un anticuerpo (es decir, es "heteróloga"), y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmuno adhesina típicamente es una secuencia de aminoácidos contigua que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia del dominio constante de inmunoglobulina en la inmuno adhesina se puede obtener de cualquier inmunoglobulina tal como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM.

[0087] La "restricción" de las reacciones de hibridación la puede determinar fácilmente el experto en la materia, y en general es un cálculo empírico que depende de la longitud de la sonda, la temperatura de lavado y la concentración salina. En general, las sondas más largas requieren temperaturas mayores para una reasociación adecuada, mientras que las sondas más cortas necesitan temperaturas menores. La hibridación en general depende de la capacidad del ADN desnaturalizado para volver a reasociarse cuando están presentes cadenas complementarias en un entorno por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor es el grado de homología deseado entre la sonda y la secuencia hibridable, mayor es la temperatura relativa que se puede usar. Como resultado, se entiende que temperaturas relativas más altas tendrán tendencia a hacer las condiciones de reacción más restrictivas, mientras que temperaturas más bajas las hacen menos restrictivas. Para detalles y explicaciones adicionales sobre la restricción de las reacciones de hibridación, véase Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995).

[0088] Las "condiciones restrictivas" o "condiciones restrictivas altas", como se definen en el presente documento, se pueden identificar como aquellas que: (1) usan fuerza iónica baja y temperatura alta para el lavado, por ejemplo cloruro sódico 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/dodecilsulfato sódico al 0,1% a 50°C; (2) usan durante la hibridación un agente desnaturalizante, tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50% (v/v) con albúmina de suero bovino al 0,1%/Ficoll al 0,1%/polivinilpirrolidona 0,1%/tampón de fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42°C; o (3) usan formamida al 50%, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico al 0,1%, 5 x disolución de Denhardt, ADN de esperma de salmón tratado con ultrasonidos (50 .g/ml), SDS al 0,1%, y sulfato de dextrano al 10% a 42°C, con lavados a 42°C en 0, 2 x SSC (cloruro sódico/citrato sódico) y formamida al 50% a 55°C, seguido de un lavado de alta restricción que consiste en 0,1 x SSC que contiene EDT A a 55°C.

[0089] Las "condiciones moderadamente restrictivas" se pueden identificar como describen Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen el uso de disolución de lavado y condiciones de hibridación (p. ej., temperatura, fuerza iónica y % de SDS) menos restrictivas que las descritas antes. Un ejemplo de condiciones moderadamente restrictivas es la incubación durante una noche a 37°C en disolución que comprende: formamida al 20%, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), 5 x disolución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10%, y 20 mg/ml de ADN de esperma de salmón fraccionado y desnaturalizado, seguido de lavado de los filtros en 1 x SSC a aproximadamente 37-50°C. El experto en la materia reconocerá cómo ajustar la temperatura, la fuerza iónica, etc., según sea necesario para acomodar factores tales como la longitud de la sonda y similares.

[0090] La expresión "marcado con epítipo" cuando se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido Angptl3 fusionado con un "polipéptido marcado". El polipéptido marcado tiene suficientes restos para proporcionar un epítipo contra el que se puede hacer un anticuerpo, pero es suficientemente corto de modo que no interfiere con la actividad del polipéptido al que está fusionado. El polipéptido marcado preferiblemente también es bastante único, de modo que el anticuerpo sustancialmente no tiene reacciones cruzadas con otros epitopos. Los polipéptidos marcados adecuados en general tienen al menos 6 restos de aminoácidos y normalmente entre aproximadamente 8 y 50 restos de aminoácidos (preferiblemente, entre aproximadamente 10 y 20 restos de aminoácidos).

- [0091]** Las expresiones "actividad biológica" y "biológicamente activo" con respecto a las moléculas de Angptl3, en el presente documento se refieren a la capacidad de una molécula para unirse específicamente y regular respuestas celulares mediadas por un receptor de integrina $\alpha\beta3$ natural, tales como la adhesión y/o migración de células endoteliales vasculares. En este contexto, el término "regula" incluye tanto la promoción como la inhibición, por lo tanto, las moléculas de Angptl3 (naturales y variantes) de la presente invención antagonistas de un receptor de integrina $\alpha\beta3$. Las actividades biológicas preferidas de los ligandos Angptl3 del presente documento incluyen la promoción o inhibición de la vascularización (angiogénesis), y en particular, la implicación en el proceso angiogénico durante la regeneración del hígado.
- 10 **[0092]** El término "agonista" se usa para referirse a análogos peptídicos y no peptídicos de las moléculas de Angptl3 naturales, y a anticuerpos que se unen específicamente a dichas moléculas de Angptl3 naturales, con la condición de que tengan la capacidad de señalizar a través de un receptor de Angptl3 natural ($\alpha\beta3$). En otras palabras, el término "agonista" se define en el contexto de la función biológica del receptor de Angptl3 ($\alpha\beta3$). Los agonistas preferidos tienen actividades biológicas preferidas de un Angptl3 natural, como se ha definido antes, tales como la promoción de la vascularización (angiogénesis), por ejemplo durante la regeneración del hígado.
- 15 **[0093]** El término "antagonista" se usa para referirse a análogos peptídicos y no peptídicos de una molécula de Angptl3 natural, y a anticuerpos, con la condición de que tengan la capacidad de inhibir la función biológica de Angptl3 independientemente de si tienen la capacidad para unirse a Angptl3 o su receptor, $\alpha\beta3$. Por consiguiente, los antagonistas que tienen la capacidad de unirse a Angptl3 o su receptor incluyen anticuerpos dirigidos contra Angptl3 y contra $\alpha\beta3$. Los antagonistas preferidos son inhibidores de la adhesión y/o migración de células endoteliales vasculares, y en particular inhibidores de la angiogénesis, en especial de la angiogénesis asociada con el crecimiento de tumores malignos, enfermedades inflamatorias del hígado y enfermedades cardíacas.
- 20 **[0094]** "Tumor" como se usa en el presente documento, se refiere a todo crecimiento y proliferación de células neoplásicas, sean malignos o benignos, y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos.
- [0095]** Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por el crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Los ejemplos más particulares de cáncer incluyen cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y diferentes tipos de cáncer de cabeza y cuello.
- 30 **[0096]** "Tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como profiláctico o medida preventivas, en la que el objeto es prevenir o ralentizar (disminuir) la afección o trastorno patológico objetivo. Los que necesitan tratamiento incluyen los que ya tienen el trastorno así como los propensos a tener el trastorno o aquellos en los que se va a prevenir el trastorno. En el tratamiento de tumores (p. ej. cáncer), un agente terapéutico puede disminuir directamente la patología de las células tumorales o hacer las células tumorales más susceptibles al tratamiento por otros agentes terapéuticos, p. ej., radiación y/o quimioterapia.
- 35 **[0097]** La "patología" del cáncer incluye todos los fenómenos que comprometen el bienestar del paciente. Esto incluye, sin limitación, crecimiento celular anormal o incontrolable, metástasis, interferencia con el funcionamiento normal de células vecinas, liberación de citoquinas u otros productos secretores en niveles anómalos, eliminación o agravamiento de la respuesta inflamatoria o inmunológica, etc.
- 45 **[0098]** La administración "crónica" se refiere a la administración del o de los agentes de un modo continuo en contraposición a un modo agudo, de modo que se mantenga el efecto (actividad) terapéutico inicial durante un periodo de tiempo prolongado. La administración "intermitente" es el tratamiento que no se hace consecutivamente sin interrupción, sino que es de naturaleza cíclica.
- 50 **[0099]** "Mamífero" para los propósitos del tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoo, deportes o mascotas, tales como perros, gatos, vacas, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos, etc. Preferiblemente, el mamífero es el ser humano.
- [0100]** La administración "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

[0101] Los "vehículos" como se usa en el presente documento incluyen vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o mamífero que se expone a los mismos en las dosificaciones y concentraciones usadas. A menudo, el vehículo fisiológicamente aceptable es una disolución acuosa de pH tamponado. Los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como de fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico; polipéptido de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS™.

[0102] Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de diferentes tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivos, que es útil para el suministro de un fármaco (tal como un polipéptido PRO10282 o anticuerpo contra el mismo) a un mamífero. Los componentes del liposoma normalmente se disponen en una formación de bicapa, similar a la disposición de lípidos de membranas biológicas.

[0103] Una "molécula pequeña" se define en el presente documento como que tiene un peso molecular inferior a aproximadamente 500 Daltons.

[0104] Una "cantidad eficaz" de un polipéptido Angptl3 descrito en el presente documento, es una cantidad capaz de producir una respuesta biológica deseada. En particular, una "cantidad eficaz" de un polipéptido Angptl3 o un agonista del mismo, preferiblemente es una cantidad capaz de regular una respuesta celular mediada por un receptor de Angptl3 $\alpha\beta 3$, tal como la adhesión y/o migración de células endoteliales, p. ej., células endoteliales vasculares. El término incluye una cantidad capaz de invocar la angiogénesis, en especial la angiogénesis asociada con la regeneración del hígado.

[0105] Una "cantidad terapéuticamente eficaz", en referencia al tratamiento de tumores, p. ej., cuando se usan antagonistas de un polipéptido Angptl3 natural, se refiere a una cantidad capaz de invocar uno o más de los siguientes efectos: (1) inhibición, en alguna medida, del crecimiento tumoral, incluyendo la ralentización y detención completo del crecimiento; (2) reducción del número de células tumorales; (3) reducción del tamaño tumoral; (4) inhibición (es decir, reducción, ralentización o detención completa) de la infiltración de células tumorales en órganos periféricos; (5) inhibición (es decir, reducción, ralentización o detención completa) de la metástasis; (6) potenciación de la respuesta inmunitaria antitumoral, que puede, pero no tiene que, producir el retroceso o rechazo del tumor; y/o (7) alivio, en alguna medida, de uno o más síntomas asociados con el trastorno. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un antagonista del polipéptido Angptl3 para el propósito de tratamiento del tumor, se puede determinar empíricamente y de una forma rutinaria.

[0106] El "factor de crecimiento endotelial vascular" o "VEGF" es un mitógeno específico de células endoteliales que se ha mostrado que es estimulado por hipoxia y necesario para la angiogénesis tumoral. (Senger y col., *Cancer* 46:5629-5632 (1986); Kim y col., *Nature* 362:841-844 (1993); Schweiki y col., *Nature* 359:843-845 (1992); Plate y col., *Nature* 359:845-848 (1992)). La expresión, como se usa en el presente documento, incluye todas las isoformas de VEGF, incluyendo sin limitación, las isoformas VEGF121 y VEGF165 humanas.

B. Homólogos de Angptl3 humano de mamífero no humano

[0107] El aislamiento de Angptl3 humano natural se describe en el ejemplo 1, y también en la publicación PCT WO 99/15654. El ADN de Angptl3 también se ha depositado en la American type Culture Collection (ATCC) el 18 de septiembre de 1997, con la denominación FLS139-DNA16451-1078, y nº de depósito en ATCC asignado 209283.

[0108] Con el fin de identificar otros homólogos de mamífero no humano, o variantes de empalme u otras variantes que se encuentran de forma natural, se han cribado bibliotecas con sondas (tales como anticuerpos contra la secuencia de Angptl3 humana u oligonucleótidos de al menos aproximadamente 20-80 bases) designadas para identificar el gen de interés o proteína codificada por el mismo. El cribado de bibliotecas de ADNc o genómicas con la sonda seleccionada, se puede llevar a cabo usando procedimientos estándar, tales como los descritos en Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Un medio alternativo de aislar el gen que codifica otros polipéptidos Angptl3 naturales es usar la metodología de la PCR (Sambrook y col., véase antes; Dieffenbach y col., *PCR Primer: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor

Laboratory Press, 1995)).

- [0109]** Las secuencias de oligonucleótidos seleccionadas como sondas deben tener una longitud suficiente y ser suficientemente no ambiguas para que se minimicen los falsos positivos. El oligonucleótido preferiblemente se marca de modo que se puede detectar tras hibridación con el ADN en la biblioteca que se está cribando. Los procedimientos de marcaje son bien conocidos en la materia, e incluyen el uso de radiomarcadores tales como ATP marcado con ³²P, biotilación o marcaje enzimático. Las condiciones de hibridación, incluyendo la restricción moderada y restricción alta, se proporcionan en Sambrook y col., véase antes.
- 10 **[0110]** Las secuencias identificadas en dichos procedimientos de cribado de bibliotecas se pueden comparar y alinear con otras secuencias conocidas depositadas y disponibles en bases de datos públicas tales como GenBank u otras bases de datos de secuencias privadas. La identidad de secuencia (a nivel de aminoácidos o de nucleótidos) dentro de regiones definidas de la molécula o a lo largo de toda la longitud de la secuencia, se puede determinar usando procedimientos conocidos en la materia y descritos en el presente documento.
- 15 **[0111]** El ácido nucleico que tiene la secuencia que codifica la proteína se puede obtener por cribado de bibliotecas de ADNc o genómicas seleccionadas, usando la secuencia de aminoácidos deducida en el presente documento la primera vez, y si es necesario, usando procedimientos de extensión de cebador convencionales como se describe en Sambrook y col., véase antes, para detectar precursores e intermedios del procesamiento del ARNm que pueden no haber sido transcritos inversamente a ADNc.
- 20

C. Variantes de Angptl3

- [0112]** El Angptl3 humano natural se conoce en la materia y se ha descrito, por ejemplo, en la publicación PCT WO 99/15654 publicada el 1 de abril de 1999. Las variaciones en la secuencia de Angptl3 natural de longitud completa (SEQ ID NO: 2) o en diferentes dominios de la secuencia de aminoácidos de Angptl3 descrita en el presente documento, se pueden hacer, por ejemplo, usando cualquiera de las técnicas y directrices para las mutaciones conservativas y no conservativas expuestas, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, eliminación o inserción de uno o más codones que codifican el polipéptido Angptl3 que dan como resultado un cambio en la secuencia de aminoácidos de Angptl3 comparada con la secuencia natural de la SEQ ID NO: 2. Opcionalmente, la variación es por sustitución de al menos un aminoácido por cualquier otro aminoácido en uno o más de los dominios de una secuencia de Angptl3 natural o variante. Se puede encontrar una orientación para determinar qué resto de aminoácido se puede insertar, sustituir o eliminar sin afectar de forma adversa la actividad deseada, comparando la secuencia de Angptl3 con la de moléculas proteínicas conocidas homólogas y minimizando el número de cambios en la secuencia de aminoácidos hechos en regiones de alta homología. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de sustituir un aminoácido por otro aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas similares, tal como la sustitución de una leucina por una serina, es decir, sustituciones de aminoácidos conservativos. Las inserciones o eliminaciones pueden estar opcionalmente en el intervalo de 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida se puede determinar haciendo sistemáticamente inserciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia y ensayando en las variantes resultantes la actividad presentada por la secuencia natural madura o de longitud completa.
- 25
- 30
- 35
- 40

- [0113]** Por lo tanto, se proporcionan en el presente documento fragmentos de polipéptidos Angptl3. Dichos fragmentos pueden estar truncados en el extremo N o extremo C, o pueden carecer de restos internos, por ejemplo, cuando se comparan con una proteína natural de longitud completa. Algunos fragmentos carecen de restos de aminoácidos que no son esenciales para una actividad biológica deseada del polipéptido Angptl3.
- 45

- [0114]** El modelado de homología del dominio de fibrinógeno de Angptl3 humano natural de SEQ ID NO: 2, y el análisis funcional de los dominios implicados en la unión a células endoteliales de Angptl3, como se describe en el ejemplo 5, son útiles para diseñar variantes de Angptl3 en el presente documento. Basándose en la estructura modelada del dominio de tipo fibrinógeno de Angptl3, se encontró que las regiones P1: aminoácidos 281-293 (SEQ ID NO: 14); P2: aminoácidos 442-460 (SEQ ID NO: 15); y P3 aminoácidos 415-430 (SEQ ID NO: 17) de Angptl3 humano natural (SEQ ID NO: 2), están implicados en la unión de $\alpha v \beta 3$. Con el fin de retener la unión al receptor y la capacidad de activar y señalar a través del receptor, deben retenerse sustancialmente las regiones P1, P2 y P3, o en estas regiones solo deben realizarse sustituciones conservativas. Por otra parte, con el fin de diseñar antagonistas de Angptl3, puede ser necesario hacer alteraciones de aminoácidos más significativas en una o más de esas regiones. Se ayuda además al diseño de las variantes de Angptl3 mediante el diagrama de cintas mostrado en la figura 5B y el alineamiento de secuencias mostrado en la figura 5C, donde los restos hidrófilos y cargados se presentan en azul, y los restos aromáticos e hidrófobos se presentan en naranja.
- 50
- 55

[0115] Como se ha discutido antes, en realizaciones particulares, las sustituciones conservativas tienen interés para hacer variantes de Angptl3 de la presente invención. Dichas sustituciones conservativas se muestran en la tabla 1 bajo el encabezamiento de sustituciones preferidas. Si dichas sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces se introducen cambios más sustanciales, denominados sustituciones de ejemplo en la tabla 1, o como se describe con más detalle a continuación en referencia a las clases de aminoácidos, y se criban los productos.

Tabla 1

10

<u>Resto original</u>	<u>Sustituciones de ejemplo</u>	<u>Sustituciones preferidas</u>
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

[0116] Las modificaciones sustanciales en la función o identidad inmunológica del polipéptido variante de Angptl3 se llevan a cabo seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura de la cadena principal del polipéptido en la zona de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los restos que se encuentran de forma natural se dividen en grupos basados en las propiedades comunes de la cadena lateral:

- (1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
 (2) hidrófilos neutros: cys, ser, thr;
 (3) ácidos: asp, glu;
 (4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;
 (5) restos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y
 (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

25

[0117] Las sustituciones no conservativas implicarán intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase. Dichos restos sustituidos también se pueden introducir en los sitios de sustituciones conservativas, o más preferiblemente, en los sitios restantes (no conservados).

[0118] Las variaciones se pueden hacer usando procedimientos conocidos en la materia tales como mutagénesis mediada por oligonucleótido (dirigida al sitio), barrido de alanina, y mutagénesis dirigida por PCR. Se pueden llevar a cabo la mutagénesis dirigida al sitio (Carter y col., *Nucl. Acids Res.*, 13: 4331 (1986); Zoller y col., *Nucl. Acids Res.*, 10:6487 (1987)), mutagénesis en casete [Wells y col., *Gene*, 34:315 (1985)], mutagénesis de selección por restricción (Wells y col., *Philos. Trans. R. Soc. London SerA*, 317:415 (1986)) u otras técnicas conocidas, en el ADN clonado para producir el ADN variante de Angptl3.

35

[0119] Los fragmentos de Angptl3 se pueden preparar por cualquiera de una serie de técnicas convencionales. Los fragmentos de péptidos deseados se pueden sintetizar químicamente. Un procedimiento alternativo implica la

generación de fragmentos de Angptl3 por digestión enzimática, p. ej., tratando la proteína con una enzima que se sabe que escinde proteínas en sitios definidos por restos de aminoácidos particulares o por digestión del ADN con enzimas de restricción adecuadas y aislamiento del fragmento deseado. Otra técnica adecuada más implica el aislamiento y la amplificación de un fragmento de ADN que codifica el fragmento de polipéptido deseado, por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos que definen los extremos deseados del fragmento de ADN se usan en los cebadores 5' y 3' en la PCR. Preferiblemente, los fragmentos de polipéptido Angptl3 comparten al menos una actividad biológica y/o inmunológica con el Angptl3 natural de SEQ ID NO: 2.

[0120] También se puede usar el análisis por barrido de aminoácidos para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos de barrido preferidos están los aminoácidos neutros relativamente pequeños. Dichos aminoácidos incluyen alanina, glicina, serina y cisteína. La alanina es un aminoácido de barrido típicamente preferido entre este grupo porque elimina la cadena lateral más allá del carbono beta y es menos probable que altere la conformación de la cadena principal de la variante (Cunningham y Wells, *Science*, 244: 1081-1085 (1989)). También se prefiere típicamente la alanina porque es el aminoácido más común. Además, se encuentra con frecuencia tanto en posiciones enterradas como expuestas (Creighton, *The Proteins*, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, *J. Mol. Biol.*, 150:1 (1976)). Si la sustitución de alanina no da cantidades adecuadas de variante, se puede usar un aminoácido isotérico.

[0121] Se proporcionan más detalles para hacer variantes de Angptl3, modificaciones covalentes de polipéptidos Angptl3 naturales y variantes, anticuerpos que se unen específicamente a Angptl3 (incluyendo variantes) e inmunoadhesinas, por ejemplo, en el documento WO 99/15654.

D. Uso de polipéptidos Angptl3

[0122] Como se describe en los ejemplos más adelante, el análisis de la expresión de Angptl3 en tejidos adultos demostró la expresión específica en el hígado y la fuerte regulación por aumento en hepatocitos de enfermedades, hígado cirrótico o después de lesión hepática tóxica. Además, la administración in vivo de Angptl3 produjo un aumento de la permeabilidad vascular y un efecto protector a corto plazo frente a daño en el hígado, pero la expresión prolongada de Angptl3 se asoció con la lesión hepática. Incluso además, Angptl3 indujo angiogénesis cuando se ensayó en el ensayo de córnea de rata in vivo. La inducción fuerte de crecimiento de vasos por Angptl3 en este último ensayo combinado con la expresión pronunciada detectada en muestras de hígado enfermo, indica claramente que este factor tiene una función importante en la regulación del proceso angiogénico durante la regeneración del hígado.

[0123] Por consiguiente, se cree que Angptl3 y agonistas de Angptl3 son útiles en el tratamiento, prevención y/o identificación de sujetos con riesgo de enfermedad hepática aguda y en la inducción de regeneración del hígado después de lesión hepática aguda y/o angiogénesis en un tejido. La lesión hepática aguda puede estar asociada con enfermedad hepática inflamatoria, tal como hepatitis crónica, alcohólica o vírica, lesión química o mecánica del hígado, hepatectomía que puede deberse a hepatitis crónica, cirrosis hepática, cáncer hepático primario o metastático o cáncer de vesícula. La angiogénesis en un tejido se puede asociar con tejido cardíaco o tejido hepático que ha sido dañado como resultado de un proceso infeccioso o autoinmune, lesión mecánica o química o cáncer o cáncer metastático.

[0124] Por consiguiente, se cree que los antagonistas de Angptl3 son útiles en el tratamiento y/o prevención de daño tisular caracterizado por el exceso de expresión de Angptl3, una enfermedad hepática crónica y/o una enfermedad cardíaca caracterizada por la elevada expresión de Angptl3. El daño tisular caracterizado por el exceso de expresión de Angptl3 incluye el daño del tejido hepático asociado con inflamación, sin limitación inflamación asociada con una enfermedad hepática crónica, la patogénesis que implica la activación y reclutamiento de células inflamatorias al hígado, independientemente de si la causa subyacente es una enfermedad infecciosa o autoinmunitaria, o lesión química del hígado, u otros. Por lo tanto, el daño del tejido hepático caracterizado por el exceso de expresión de Angptl3 incluye cirrosis hepática, tal como cirrosis hepática alcohólica y cirrosis biliar primaria (CBP), fibrosis hepática, hepatitis crónica, tal como hepatitis autoinmunitaria crónica, hepatitis alcohólica crónica, y esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), hepatitis vírica A, B, C, D, E y G, daño hepático metabólico tóxico, lesión por isquemia-reperfusión del hígado y septicemia, y daño hepático asociado con tumor hepático, sin limitación carcinoma hepatocelular, carcinoma de las vías biliares extrahepáticas, colangiocarcinoma y cáncer metastático del hígado. El daño del tejido cardíaco asociado con la expresión elevada de Angptl3 o enfermedad cardíaca, cuya patogénesis incluye una respuesta inflamatoria, o en cuyo desarrollo la inflamación es un factor de riesgo y el daño del tejido cardíaco asociado con la expresión elevada de Angptl3, sin limitación enfermedad arterial coronaria, cardiomiopatía, tal como hipertrofia no específica y cardiomiopatía dilatada, miocarditis, insuficiencia cardíaca

congestiva (ICC) e infarto de miocardio. Para una revisión véase Lawson y col., *Toxicol. Sci.* 54:509-16 (2000), véase antes.

[0125] Además, se cree que los antagonistas de Angptl3 son útiles en la inhibición del aumento indeseado de la permeabilidad vascular en un tejido. El tejido puede ser tejido hepático o cardiaco. El aumento de la permeabilidad vascular puede ser un aumento de permeabilidad de vasos pequeños después de daño tisular y puede ser después de necrosis del endotelio vascular, debido a la exposición a toxinas, o puede estar asociado con inflamación, tal como inflamación crónica/tratamiento y/o prevención de daño tisular caracterizado por el exceso de expresión de Angptl3, una enfermedad hepaticacrónica y/o enfermedad cardiaca caracterizada por la expresión elevada de Angptl3.

[0126] Aún más, se cree que los antagonistas de Angptl3 son útiles en la prevención y/o tratamiento de la hepatitis alcohólica crónica, que resulta del consumo excesivo de alcohol. La hepatitis alcohólica puede variar desde una hepatitis leve, siendo las pruebas de laboratorio anómalas la única indicación de enfermedad, a disfunción hepática grave con complicaciones tales como ictericia (piel amarilla causada por la retención de bilirrubina), encefalopatía hepática (disfunción neurológica causada por insuficiencia hepática), ascitis (acumulación de fluido en el abdomen), varices esofágicas sangrantes (venas varicosas en el esófago), coagulación de sangre anómala y coma.

[0127] Esta invención también abarca las enfermedades mediadas por linfocitos T que afectan al hígado. El daño autoinmune de los linfocitos T es mediado directamente por linfocitos T citotóxicos e indirectamente por linfocitos T cooperadores. Las enfermedades autoinmunitarias, cuyo tratamiento se contempla en el presente documento, incluyen, sin limitación, hepatitis autoinmunitaria y cirrosis biliar primaria. La hepatitis autoinmunitaria (también conocida como hepatitis activa crónica autoinmunitaria) es un trastorno crónico caracterizado por la necrosis e inflamación hepatocelular continuas, que si no se trata, normalmente avanza a la cirrosis y finalmente insuficiencia hepática. La cirrosis biliar primaria es una enfermedad autoinmunitaria del sistema interhepático o biliar, y está asociado con la secreción biliar alterada. Se cree que los anticuerpos autoinmunes y los linfocitos T median el daño tisular al hígado, asociado con esta enfermedad.

[0128] Los antagonistas de Angptl3 también son útiles en el tratamiento de la lesión por isquemia-reperfusión del hígado. Como se ha discutido antes, la lesión por isquemia-reperfusión se produce en general cuando el flujo de sangre a una región del cuerpo se detiene temporalmente (isquemia) y después se restablece (reperfusión). La lesión puede ocurrir en partes del cuerpo en las que se ha interrumpido el suministro de sangre, o puede ocurrir en partes con suministro completo de sangre durante el periodo de isquemia. La lesión por isquemia-reperfusión del hígado puede ser resultado de diferentes causas subyacentes tales como, por ejemplo, de resecciones quirúrgicas hepáticas y biliares, y clínicamente se manifiesta por complicaciones tales como disfunción hepática incluyendo daño hepatocelular y necrosis.

[0129] Los antagonistas de Angptl3 incluyen, sin limitación, anticuerpos, moléculas orgánicas e inorgánicas pequeñas, péptidos, fosfopéptidos, moléculas de sentido contrario y ribozimas, moléculas de triple hélice, etc., que inhiben la expresión y/o actividad del producto génico objetivo.

[0130] Por ejemplo, las moléculas de ARN de sentido contrario y de ARN actúan para bloquear directamente la traducción del ARNm por hibridación con el ARNm objetivo y previniendo la traducción de la proteína. Cuando se usa ADN de sentido contrario, se prefieren los oligodesoxirribonucleótidos derivados del sitio de inicio de la traducción, p. ej., entre aproximadamente las posiciones -10 y +10 de la secuencia de nucleótidos del gen objetivo.

[0131] Los ribozimas son moléculas enzimáticas de ARN capaces de catalizar la escisión específica del ARN. Los ribozimas actúan por hibridación específica de secuencia con el ARN complementario diana que se puede identificar mediante técnicas conocidas. Los sitios de escisión de ribozimas específicos en un potencial ARN objetivo se pueden identificar por técnicas conocidas. Para más detalles véase, por ejemplo, Rossi, *Current Biology*, 4:469-4.71 (1994), y publicación PCT n° WO 97/33551 (publicado el 18 de septiembre de 1997).

[0132] Las moléculas de ácido nucleico en formación de triple hélice usada para inhibir la transcripción deben ser monocatenarias y estar compuestas de desoxinucleótidos. La composición de bases de estos oligonucleótidos está diseñada de modo que promueve la formación de triple hélice por las reglas de emparejamiento de bases de Hoogsteen, que en general requiere tramos bastante grandes de purinas o pirimidinas en una cadena de un dúplex. Para más detalles véase, p. ej., la publicación PCT n° WO 97/33551, véase antes.

[0133] Cuando se usan los polipéptidos Angptl3 del presente documento (incluyendo sus agonistas y

antagonistas) como agentes terapéuticos, se pueden formular de acuerdo con procedimientos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, según los cuales el polipéptido Angptl3 se combina mezclándolo con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones terapéuticas se preparan para almacenamiento mezclándolas con el principio activo que tiene el grado de pureza deseado, con vehículos, excipientes o estabilizantes fisiológicamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o disoluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes adecuados no tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones usadas, incluyen tampones tales como de fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o PEG.

15 **[0134]** Las formulaciones para usar para la administración in vivo deben ser estériles. Esto se logra fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estéril, antes o después de liofilización y reconstitución.

[0135] Las composiciones terapéuticas del presente documento en general se ponen en un envase que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de disolución intravenosa o vial que tiene un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica.

[0136] La vía de administración está de acuerdo con procedimientos conocidos, p. ej., inyección o infusión por vías intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial o intralesional, administración tópica o por sistemas de liberación sostenida.

25 **[0137]** Las dosificaciones y concentraciones de fármaco deseadas de las composiciones farmacéuticas de la presente invención, pueden variar dependiendo del uso particular previsto. La determinación de la dosificación o vía de administración adecuadas se basa en el criterio del médico que atiende. Los experimentos con animales proporcionan una guía fiable para la determinación de las dosis eficaces para la terapia humana. El escalado interespecie de las dosis eficaces se puede realizar siguiendo los principios establecidos por Mordenti, J. y Chappell, W. "The use of interspecies scaling in toxicokinetics" en *Toxicokinetics and New Drug Development*, Yacobi y col., Eds., Pergamon Press, New York 1989, pp. 42-96.

35 **[0138]** Cuando se usa la administración in vivo de un polipéptido Angptl3 o agonista o antagonista del mismo, las cantidades de dosificación normales pueden variar de aproximadamente 10 ng/kg hasta 100 mg/kg de peso corporal del mamífero o más por día, preferiblemente de aproximadamente 1 .g/kg/día a 10 mg/kg/día, dependiendo de la vía de administración. En la bibliografía se proporciona orientación sobre las dosificaciones particulares y los procedimientos de suministro; véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 4.657.760; 5.206.344; o 5.225.212. Se prevé que diferentes formulaciones serán eficaces para diferentes compuestos de tratamiento y diferentes trastornos, que la administración dirigida a un órgano o tejido, por ejemplo, puede necesitar el suministro de una forma diferente que otro órgano o tejido.

45 **[0139]** Por ejemplo, antes de determinar la dosificación eficaz para el tratamiento de cualquier enfermedad hepática específica, se determina la gravedad de la enfermedad por evaluación convencional clínica y de laboratorio del paciente. El beneficio del tratamiento se valora por seguimiento de la función hepática con valoración clínica y de laboratorio, realizada a intervalos regulares, tales como cada semana, dos semanas o mensual.

50 **[0140]** Cuando se desea la administración de liberación sostenida de un polipéptido Angptl3 en una formulación con características de liberación adecuadas para el tratamiento de cualquier enfermedad o trastorno que requieren la administración del polipéptido Angptl3, se contempla la microencapsulación del polipéptido Angptl3. La microencapsulación de proteínas recombinantes para la liberación sostenida se ha realizado con éxito con la hormona del crecimiento humana (rhGH), interferón- γ (rhIFN- γ), interleuquina-2, y MN rgp120. Johnson y col., *Nat. Med.*, 2:795-799 (1996); Yasuda, *Biomed. Ther.*, 27:1221-1223 (1993); Hora y col., *Bio/Technology*, 8:755-758 (1990); Cleland, "Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems," en *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*, Powell and Newman, eds, (Plenum Press: New York, 1995), págs. 439-462; documentos WO 97/03692, WO 96/40072, WO 96/07399; y patente de EE.UU. nº 5.654.010.

[0141] Las formulaciones de liberación sostenida de estas proteínas se desarrollaron usando polímero de

poli(ácido láctico-glicólico) (PLGA) debido a su biocompatibilidad y su amplia variedad de propiedades biodegradables. Los productos de degradación del PLGA, los ácidos láctico y glicólico, se pueden eliminar rápidamente dentro del cuerpo humano. Además, la degradabilidad de estos polímeros se puede ajustar desde meses hasta años dependiendo de su peso molecular y composición. Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer," en: M. Chasin y R. Langer (Eds.), *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems* (Marcel Dekker: New York, 1990), pág. 1-41.

[0142] Puede ser conveniente combinar los agentes terapéuticos de Angptl3 con otros regímenes terapéuticos. Por ejemplo, el tratamiento con los polipéptidos Angptl3 o sus agonistas, se puede combinar con la administración de otros factores angiogénicos, tales como factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGF) o factor de crecimiento de fibroblastos (FGF).

E. Artículos de fabricación

[0143] En el presente documento se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el diagnóstico o tratamiento de los trastornos descritos antes. El artículo de fabricación comprende un envase y una etiqueta. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los envases pueden estar formados de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El envase contiene la composición que es eficaz para el diagnóstico o tratamiento de la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el envase puede ser una bolsa de disolución intravenosa, o un vial que tiene un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica). El agente activo en la composición normalmente es un agente antitumoral capaz de interferir con la actividad de un producto génico identificado en el presente documento, p. ej., un anticuerpo. La etiqueta en, o asociada con, el envase indica que la composición se usa para el diagnóstico o tratamiento de la afección seleccionada. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo envase que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como disolución salina tamponada con fosfato, disolución de Ringer y disolución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales convenientes desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas e insertos de envase con instrucciones de uso.

F. Uso para diagnóstico

[0144] Puesto que el Angptl3 es regulado por aumento en enfermedades hepáticas inflamatorias, su exceso de expresión con respecto a los tejidos normales puede servir como un marcador de diagnóstico de dichas enfermedades.

[0145] La amplificación génica y/o expresión se pueden medir en una muestra directamente, por ejemplo, por transferencia Southern convencional, transferencia Northern para cuantificar la transcripción del ARNm (Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 5201-5205 (1980)), inmunotransferencia (análisis de ADN) o hibridación in situ, usando una sonda marcada adecuadamente, basada en las secuencias proporcionadas en el presente documento. Alternativamente, se pueden usar anticuerpos que pueden reconocer dúplex específicos, incluyendo dúplex de ADN, dúplex de ARN, y dúplex híbridos de ADN-ARN o dúplex de ADN-proteína. Los anticuerpos a su vez se pueden marcar y se puede llevar a cabo el ensayo cuando el dúplex se une a una superficie, de modo que tras la formación de dúplex en la superficie, se puede detectar la presencia del anticuerpo unido al dúplex.

[0146] Por ejemplo, se pueden usar anticuerpos, incluyendo fragmentos de anticuerpos, para detectar cualitativa o cuantitativamente la expresión de proteínas Angptl3. Como se ha indicado antes, el anticuerpo preferiblemente está equipado con un marcador detectable, p. ej., fluorescente, y la unión se puede seguir por microscopía óptica, citometría de flujo, u otras técnicas conocidas en la materia. Estas técnicas son particularmente adecuadas, si el gen amplificado codifica una proteína de superficie celular, p. ej., un factor de crecimiento. Dichos ensayos de unión se llevan a cabo esencialmente como se ha descrito en la sección 5 anterior.

[0147] La detección in situ de la unión del anticuerpo a la proteína Angptl3 se puede realizar, por ejemplo, por inmunofluorescencia o microscopía inmunoelectrónica. Para este propósito, se saca una muestra de tejido del paciente, y se le aplica un anticuerpo marcado, preferiblemente cubriendo con el anticuerpo una muestra biológica. Este procedimiento también permite determinar la distribución del producto génico con marcador en el tejido examinado. Será evidente para los expertos en la materia, que están disponibles una amplia variedad de procedimientos histológicos para la detección in situ.

[0148] Uno de los procedimientos cuantitativos más sensibles y más flexibles para cuantificar la expresión

diferencial de genes es la RT-PCR, que se puede usar para comparar los niveles de ARNm en poblaciones de muestra diferentes, en tejidos normales y tumorales, con o sin tratamiento con fármaco, para caracterizar patrones de expresión de genes, para discriminar entre ARNm estrechamente relacionados y para analizar la estructura de ARN.

5

[0149] La primera etapa es el aislamiento del ARNm de una muestra objetivo. El material de partida típicamente es el ARN total aislado de un tejido enfermo y tejidos normales correspondientes. Por lo tanto, se puede extraer el ARNm, por ejemplo, de muestras congeladas o insertadas en parafina archivadas y fijadas (p. ej. fijadas con formalina) de tejido enfermo para la comparación con tejido normal del mismo tipo. Los procedimientos de extracción de ARNm son bien conocidos en la materia y se describen en libros de texto estándar de biología molecular, incluyendo Ausubel y col., *Current Protocols of Molecular Biology*, John Wiley and Sons (1997). Los procedimientos de extracción de ARN de tejidos insertados en parafina se describen, por ejemplo, en Rupp y Locker, *Lab Invest.* 56:A67 (1987), y De Andrés y col., *Bio Techniques* 18:42044 (1995). En particular, el aislamiento del ARN se puede realizar usando un kit de purificación, conjunto de tamponamiento y proteasa de fabricantes comerciales, tales como Qiagen, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Por ejemplo, el ARN total de células en cultivo se puede aislar usando minicolumnas de Qiagen RNeasy. El ARN total de muestras de tejidos se puede aislar usando RNA Stat-60 (Tel-Test).

[0150] Puesto que el ARN no puede servir como molde para la PCR, la primera etapa en el análisis de expresión génica diferencial por RT-PCR es la transcripción inversa del molde de ARN en ADNc, seguido de la amplificación exponencial en una reacción de PCR. Las dos transcriptasas inversas usadas más habitualmente son la transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV-RT) y la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina Moloney (MMLV-RT). La etapa de transcripción inversa típicamente se ceba usando cebadores específicos, hexámeros aleatorios o cebadores oligo-dT, dependiendo de las circunstancias y el objetivo del perfil de expresión. Por ejemplo, el ARN extraído se puede transcribir de forma inversa usando un kit de PCR GeneAmpRNA (Perkin Elmer, CA, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc obtenido se puede usar entonces como molde en la posterior reacción de la PCR.

[0151] Aunque la etapa de la PCR puede usar una variedad de ADN polimerasas dependientes del ADN termoestables, típicamente usa la ADN polimerasa Taq, que tiene una actividad de nucleasa 5'-3' pero carece de actividad de endonucleasa 3'-5'. Por lo tanto, la PCR con TaqMan usa la actividad de nucleasa 5' de la polimerasa Taq o Tth para hidrolizar una sonda de hibridación unida a su amplicón objetivo, pero no se puede usar ninguna enzima con actividad de nucleasa 5' equivalente. Se usan dos cebadores oligonucleótidos para generar un amplicón típico de una reacción de PCR. Se diseña un tercer oligonucleótido, o sonda, para detectar la secuencia de nucleótidos situada entre los dos cebadores de la PCR. La sonda no es extensible por la enzima ADN polimerasa Taq, y está marcada con un colorante fluorescente indicador y un colorante fluorescente atenuador. Cualquier emisión inducida por láser del colorante indicador es atenuada por el colorante atenuador cuando los dos colorantes están situados cerca uno de otro, como lo están en la sonda. Durante la reacción de amplificación, la enzima ADN polimerasa Taq escinde la sonda de una forma dependiente del molde. Los fragmentos de sonda resultantes se disocian en disolución, y la señal del colorante indicador liberado carece del efecto de atenuación del segundo fluoróforo. Se libera una molécula de colorante indicador por cada nueva molécula sintetizada, y la detección del colorante indicador no atenuado proporciona la base para la interpretación cuantitativa de los datos.

[0152] La RT-PCR con TaqMan se puede llevar a cabo usando equipamientos disponibles en el comercio, tales como, por ejemplo, el sistema de detección de secuencias ABI PRIZM 7700™ Sequence Detection System™ (Perkin-Elmer-Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.), o Lightcycler (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania). En una realización preferida, el procedimiento de la nucleasa 5' se lleva a cabo en un dispositivo de PCR cuantitativa en tiempo real tal como el ABI PRIZM 7700™ Sequence Detection System™. El sistema consiste en un termociclador, láser, cámara con dispositivo de carga acoplada (CCD) y ordenador. El sistema amplifica muestras en un formato de 96 pocillos en un termociclador. Durante la amplificación, la señal fluorescente inducida por láser se recoge en tiempo real a través de cables de fibra óptica para los 96 pocillos, y se detecta en la CCD. El sistema incluye software para manejar el instrumento y analizar los datos.

[0153] Los datos de ensayo de nucleasa 5' son expresados inicialmente como Ct, o ciclo umbral. Como se ha discutido antes, los valores de fluorescencia son recogidos durante cada ciclo y representan la cantidad de producto amplificado hasta ese momento de la reacción de amplificación. El momento en el que la señal fluorescente se registra por primera vez como estadísticamente significativa es el ciclo umbral (C_t). Los valores de ΔC_t se usan como medida cuantitativa del número relativo de copias que empiezan de una secuencia objetivo particular en una muestra de ácido nucleico, cuando se compara la expresión del ARN en una célula de un tejido enfermo con el de

una célula normal.

[0154] Para minimizar errores y el efecto de la variación de muestra a muestra, la RT-PCR normalmente se lleva a cabo usando una referencia interna. La referencia interna ideal se expresa con un nivel constante entre diferentes tejidos, y no le afecta el tratamiento experimental. Los ARN usados con más frecuencia para normalizar patrones de expresión génica son los ARNm para los genes de mantenimiento de la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) y β -actina.

[0155] La expresión génica diferencial también se puede identificar o confirmar usando la técnica de micromatriz. En este procedimiento, las secuencias de nucleótidos de interés se ponen en placas, o matrices, en un sustrato de microchip. Las secuencias en matrices después se hibridan con sondas de ADN específicas de células o tejidos de interés.

[0156] En una realización específica de la técnica de micromatrices, insertos amplificados por la PCR de clones de ADNc se aplican a un sustrato en una matriz densa. Preferiblemente, se aplican al menos 10.000 secuencias de nucleótidos al sustrato. Los genes en micromatrices, inmovilizados sobre el microchip, con 10.000 elementos cada uno, son adecuados para la hibridación en condiciones restrictivas. Las sondas de ADNc marcadas con fluorescencia se pueden generar por la incorporación de nucleótidos fluorescentes por transcripción inversa de ARN extraído de tejidos de interés. Las sondas de ADNc marcadas aplicadas al chip hibridan con especificidad con cada mancha de ADN en la matriz. Después de lavado restrictivo para eliminar las sondas unidas de forma no específica, se hace un barrido del chip por microscopía láser confocal. La cuantificación de la hibridación de cada elemento de la matriz permite evaluar la correspondiente abundancia de ARNm. Con fluorescencia de doble color, hibridan con la matriz pares sondas de ADNc marcadas por separado generadas de dos fuentes de ARN. Así, la abundancia relativa de los transcritos de dos fuentes correspondientes a cada gen especificado, se determina simultáneamente. La escala miniaturizada de la hibridación proporciona una evaluación conveniente y rápida del patrón de expresión de muchos genes. Se ha mostrado que dichos procedimientos tienen la sensibilidad requerida para detectar transcritos raros, que son expresados en algunas copias por célula, y detectar de forma reproducible al menos diferencias de aproximadamente dos veces en los niveles de expresión (Schena y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(20): 106-49 (1996)). La metodología de hibridación de ácidos nucleicos y tecnología de micromatrices es bien conocida en la técnica.

[0157] Los siguientes ejemplos se ofrecen solo con propósito ilustrativo, y no se pretende que limiten el alcance de la presente invención de ninguna forma.

35 **EJEMPLOS**

[0158] Los reactivos disponibles en el comercio a los que se hace referencia en los ejemplos se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante, salvo que se indique otra cosa. La fuente de las células identificadas en los siguientes ejemplos, y a lo largo de la memoria descriptiva, por los números de acceso en ATCC es la American Type Culture Collection, Manassas, VA.

EJEMPLO 1

Identificación de Angptl3

[0159] El Angptl3 se identificó en una biblioteca de ADNc preparada a partir de ARNm de hígado fetal humano obtenido de Clontech Laboratories, Inc. Palo Alto, CA EE.UU., nº de catálogo 64018-1, siguiendo el protocolo descrito en "Instruction Manual: Superscript® Lambda System for cDNA Synthesis and λ cloning," nº de catálogo 19643-014, Life Technologies, Gaithersburg, MD, EE.UU. Salvo que se indique otra cosa, todos los reactivos se obtuvieron de Life Technologies. El procedimiento total se puede resumir en las siguientes etapas: (1) Síntesis de la primera cadena; (2) Síntesis de la segunda cadena; (3) Adición de adaptador; (4) Digestión enzimática; (5) Aislamiento en gel del ADNc; (6) Ligado en vector; y (7) Transformación.

Síntesis de la primera cadena

[0160] Se añadió el cebador-adaptador Not1 (Life Tech., 2 μ l, 0,5 μ g/ μ l) a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml estéril al que se añadió poli A + ARNm (7 μ l, 5 μ g). El tubo de reacción se calentó a 70°C durante 5 min o el tiempo suficiente para desnaturalizar la estructura secundaria del ARNm. Después la reacción se enfrió en hielo y se añadieron 5X tampón de la primera cadena (Life Tech., 4 μ l), DTT 0,1 M (2 μ l) y dNTP Mix 10 mM (Life Tech., 1 μ l) y

después se calentó a 37°C durante 2 min para equilibrar la temperatura. Después se añadió la transcriptasa inversa Superscript II® (Life Tech., 5 µl), el tubo de reacción se mezcló bien y se incubó a 37°C durante 1 h, y se terminó poniéndola sobre hielo. La concentración final de los reaccionantes era la siguiente: Tris-HCl 50 mM (pH 8,3); KCl 75 mM; MgCl₂ 3 mM; DTT 10 mM; dATP, dCTP, dGTP y dTTP cada uno 500 µM; cebador-adaptador Not1 50 µg/ml; 5 ARNm 5 µg (250 µg/ml); transcriptasa inversa Superscript II® 50.000 U/ml.

Síntesis de la segunda cadena

[0161] Mientras estaba en hielo, se añadieron los siguientes reactivos al tubo de reacción de la síntesis de la primera cadena, la reacción se mezcló bien y se dejó reaccionar a 16°C durante 2 h, teniendo cuidado de no permitir que la temperatura subiera a más de 16°C: agua destilada (93 µl); 5X tampón de la segunda cadena (30 µl); mezcla de dNTP (3 µl); ADN ligasa de E. Coli 10 U/µl (1 µl); ADN polimerasa I de E. coli 10 U/µl (4 µl); RNasa H de E. Coli 2 U/µl H (1 µl). Se añadieron 10 U de ADN polimerasa T4 (2 µl) y la reacción se continuó incubando a 16°C durante otros 5 min. La concentración final de la reacción era la siguiente: Tris-HCl 25 mM (pH 7,5); KCl 100 mM; MgCl₂ 5 mM; (NH₄)₂SO₄ 10 mM; β-NAD⁺ 0,15 mM; dATP, dCTP, dGTP, dTTP 250 µM de cada uno; DTT 1,2 mM; ADN ligasa 65 U/ml; ADN polimerasa I 250 U/ml; RNasa H 13 U/ml. La reacción se detuvo poniéndola sobre hielo por adición de EDTA 0,5 M (10 µl), y después se extrajo con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1, 150 µl). Se separó la fase acuosa, se recogió y se diluyó en NaCl 5 M (15 µl) y etanol absoluto (-20°C, 400 µl) y se centrifugó durante 2 min a 14.000 x g. El líquido sobrenadante se separó con cuidado del sedimento de ADN resultante, el sedimento se volvió a suspender en etanol al 70% (0,5 ml) y se volvió a centrifugar durante 2 min a 14.000 x g. El líquido sobrenadante se separó otra vez y el sedimento se secó en un SpeedVac.

Adición del adaptador

[0162] Se añadieron los siguientes reactivos al sedimento de ADNc de la síntesis de la segunda cadena anterior, y la reacción se mezcló suavemente y se incubó a 16°C durante 16 h: agua destilada (25 µl); 5X tampón de ADN ligasa T4 (10 µl); adaptadores Sal I (10 µl); ADN ligasa T4 (5 µl). La composición final de la reacción era la siguiente: Tris-HCl 50 mM (pH 7,6); MgCl₂ 10 mM; ATP 1 mM; PEG 8000 al 5% (p/v); DTT 1 mM; adaptadores Sal I 200 µg/ml; ADN ligasa T4 100 U/ml. La reacción se extrajo con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1, 50 µl), se separó la fase acuosa, se recogió y se diluyó en NaCl 5 M (8 µl) y etanol absoluto (-20°C, 250 µl). Esto después se centrifugó durante 20 min a 14.000 x g, se separó el líquido sobrenadante y el sedimento se volvió a suspender en 0,5 ml de etanol al 70%, y se volvió a centrifugar durante 2 min a 14.000 x g. Posteriormente, se separó el líquido sobrenadante y el sedimento resultante se secó en un SpeedVac y se llevó al siguiente procedimiento.

35 Digestión enzimática

[0163] Al ADNc preparado con el adaptador Sal I del apartado previo, se añadieron los siguientes reactivos, y la mezcla se incubó a 37°C durante 2 h: agua tratada con DEPC (41 µl), tampón de restricción de Not I (REACT, Life Tech., 5 µl), Not I (4 µl). La composición final de esta reacción era la siguiente: Tris-HCl 50 mM (pH 8,0); MgCl₂ 10 mM; NaCl 100 mM; Not I 1.200 U/ml.

Aislamiento del ADNc en gel

[0164] El ADNc se fraccionó por tamaños mediante electroforesis en gel de acrilamida en un gel de acrilamida al 5%, y se cortó del gel cualquier fragmento que fuera mayor que 1 kb, determinado por comparación con un marcador de peso molecular. Después el ADNc se electroeluyó del gel en 0,1 x tampón de TBE (200 µl) y se extrajo con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1, 200 µl). Se separó la fase acuosa, se recogió y se centrifugó durante 20 min a 14.000 x g. Se separó el líquido sobrenadante del sedimento de ADN el cual se volvió a suspender en etanol al 70% (0,5 ml), y se volvió a centrifugar durante 2 min a 14.000 x g. Se volvió a descartar el líquido sobrenadante, el sedimento se secó en un SpeedVac y se volvió a suspender en agua destilada (15 µl).

Ligado del ADNc en el vector pRK5

[0165] Se añadieron los siguientes reactivos juntos y se incubaron a 16°C durante 16 h: 5X tampón de ligasa T4 (3 µl); pRK5, vector digerido con XhoI, NotI, (0,5 µg, 1 µl); ADNc preparado del apartado previo (5 µl) y agua destilada (6 µl). Posteriormente, se añadieron agua destilada adicional (70 µl) y ARNt 10 mg/ml (0,1 µl) y la reacción entera se extrajo con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Se separó la fase acuosa, se recogió y se diluyó en NaCl 5 M (10 µl) y etanol absoluto (-20°C, 250 µl). Esto después se centrifugó durante 20 min a 14.000 x g, se

decantó y el sedimento se volvió a suspender en etanol al 70% (0,5 ml), y se volvió a centrifugar durante 2 min a 14.000 x g. Después el sedimento de ADN se secó en un SpeedVac y se eluyó en agua destilada (3 µl) para usar en el siguiente procedimiento.

5 Transformación de ligado de biblioteca en bacterias:

[0166] El ADNc/vector de ADN pRK5 ligado preparado previamente se enfrió en hielo y se añadieron bacterias DH10B electrocompetentes (Life Tech., 20 µl). La mezcla de vector y bacterias después se electroporó según la recomendación de los fabricantes. Posteriormente, se añadió medio SOC (1 ml) y la mezcla se incubó a 37°C durante 30 min. Después, los transformantes se pusieron en 20 placas LB de 150 mm estándar que contenían ampicilina y se incubaron durante 16 h (37°C) para permitir que las colonias crecieran. Después, las colonias positivas se separaron por raspado y el ADN se aisló del sedimento bacteriano usando protocolos de gradiente de CsCl estándar. Por ejemplo, Ausubel y col., 2.3.1.

15 Identificación de Angptl3

[0167] El Angptl3 se identificó en la biblioteca de hígado fetal humano por cualquier procedimiento estándar conocido en la materia, incluyendo los procedimientos descritos por Klein R.D. y col. (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 7108-7113 y Jacobs (patente de EE.UU. nº 5.563.637 presentada el 16 de julio de 1996). De acuerdo con Klein y col. y Jacobs, los ADNc que codifican nuevas proteínas de mamífero unidas a membrana y secretadas, se identifican detectando sus secuencias líder secretoras usando el gen de invertasa de levadura como un sistema indicador. La enzima invertasa cataliza la rotura de la sacarosa en glucosa y fructosa, así como la rotura de la rafinosa en sacarosa y melobiosa. Es necesaria a forma secretada de la invertasa para que la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) use la sacarosa, de modo que las células de levaduras que no son capaces de producir invertasa secretada crecen poco en medios que contienen sacarosa como la única fuente de carbono y energía. Tanto Klein R.D., véase antes, como Jacobs, véase antes, aprovechan la capacidad conocida de las secuencias señal de mamífero para sustituir funcionalmente la secuencia señal natural de la invertasa de levadura. Se liga una biblioteca de ADNc de mamífero a un ADN que codifica una invertasa de levadura no secretada, se aísla el ADN ligado y se transforma en células de levadura que no contienen un gen de invertasa. Los recombinantes que contienen el gen de la invertasa de levadura no secretada ligado con una secuencia señal de mamífero son identificados basándose en su capacidad para crecer en un medio que contiene solo sacarosa o solo rafinosa como fuente de carbono. Las secuencias señal de mamífero identificadas después se usan para cribar una segunda biblioteca de ADNc de longitud completa para aislar los clones de longitud completa que codifican las correspondientes proteínas secretadas. La clonación se puede llevar a cabo, por ejemplo, por clonación de expresión o por cualquier otra técnica conocida en la materia.

[0168] Los cebadores usados para la identificación de Angptl3 son los siguientes:

[0169] OLI114 CCACGTTGGCTTGAAATTGA (SEQ ID NO: 3)

[0170] OLI115

CCTCCAGAATTGATCAAGACAATTCATGATTTGATTCTCTATCTCCAGAG (SEQ ID NO: 4)

45 **[0171]** OLI116 TCGTCTAACATAGCAAATC (SEQ ID NO: 5)

[0172] La secuencia de nucleótidos de Angptl3 se muestra en la figura 1 (SEQ. ID. NO: 1), mientras que su secuencia de aminoácidos se muestra en las figuras 2A y 2B (SEQ ID NO: 2). El Angptl3 contiene un dominio de tipo fibrinógeno (figura 3A, figuras 5A-C) que presenta un grado alto de homología de secuencia con los dos ligandos humanos conocidos del receptor TIE-2 (h-TIE2L1 y h-TIE2L2) y las angiopoyetinas humanas 1, 2 y 4 (ANG1, ANG2, ANG4, Figura 5C).

[0173] Se depositó un clon de Angptl3 en la American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, el 18 de septiembre, 1997, bajo los términos del tratado de Budapest, y se le asignó el número de depósito ATCC 209281.

[0174] EJEMPLO 2

Expresión de Angptl3

[0175] El Angptl3 humano se clonó en el vector de expresión eucariota pRK5tkNEO y el vector de baculovirus pHIF, un derivado de pVL1393 adquirido en PharMingen, CA. El ADN plasmídico se cotransfectó con el ADN BaculoGold™ (PharMingen, CA) en células de *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") (ATCC CRL 1711) usando Lipofectina (GIBCO-BRL, MD). Después de 4 días, las células se recogieron, se usaron 500 µl del líquido sobrenadante para infectar 2×10^6 células Sf9 y se amplificó el baculovirus. Después de 72 h de amplificación, las células se recogieron y se usaron 10 ml de líquido sobrenadante para infectar $7,5 \times 10^5$ células H5/ml durante 40 h. Después de recolección y filtración a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,45 µm, se purificó el líquido sobrenadante. El Angptl3 de ratón se expresó en exceso en células de ovario de hámster chino (CHO) en experimentos de transfección transitoria a gran escala. El Angptl3 humano se purificó de los líquidos sobrenadantes de las células de insecto infectadas con baculovirus desarrolladas en suspensión usando cromatografía de inunoafinidad. La columna se generó por acoplamiento de Fab dirigido contra gD con Glycophase-CPG (vidrio de poro controlado). El medio clarificado (1000 x g, 5 min y después filtrado por 0,2 µm) se cargó durante la noche a 4°C. La columna se lavó con PBS hasta que la absorbancia a 280 nm del efluente volvió al valor base y se eluyó con citrato Na 50 mM a pH 3,0. La proteína eluida se dializó (Spectra-pore; MWCO 10.000) frente a HCl 1 mM y se congeló a -70°C. Los cultivos de CHO expresados de forma transitoria que contenían Angptl3 de ratón se clarificaron y se concentraron usando una membrana de MWCO 10.000 (Amicon). Este volumen se pasó por una columna de Fab dirigido contra gD acoplado con Glycophase-CPG, como se ha descrito previamente para el Angptl3 humano. La mezcla eluida se diluyó con acetato Na 10 mM (pH 5,0) hasta una conductividad <5 mS y se cargó en un S Sepharose Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech, NJ). La columna se lavó con acetato Na 10 mM pH 5,0, hasta que la absorbancia del efluente a 280 nm volvió al valor base y se eluyó con 20 volúmenes de columna de un gradiente de NaCl 0-0,5 M en acetato Na 10 mM pH 5,0. Las fracciones que eluyeron con NaCl 0,45 M - 0,5 M, que contenían el Angptl3 de ratón, se purificaron más usando cromatografía C-4 de fase inversa (Vydac, CA). Las fracciones se acidificaron con gradiente de ácido trifluoroacético al 0,1%. El Angptl3 de ratón eluyó con 67% de acetonitrilo, se liofilizó y se almacenó a -70°C. Las proteínas purificadas identificadas se verificaron por análisis de la secuencia N-terminal. La concentración de LPS se verificó usando kits comerciales y se determinó que era <5 Eu/ml para todas las preparaciones de Angptl3 humanas o murinas.

EJEMPLO 3

30 Preparación de anticuerpos que se unen a Angptl3

[0176] Este ejemplo ilustra la preparación de anticuerpo monoclonales que se unen específicamente a Angptl3.

35 **[0177]** Las técnicas para producir anticuerpos monoclonales son conocidas en la materia y se describen, por ejemplo en Goding, véase antes. Los inmunógenos que se pueden usar incluyen homólogos de ligandos purificados de la presente invención, proteínas de fusión que contienen dichos homólogos de ligandos, y células que expresan homólogos de ligandos recombinantes sobre la superficie celular. La selección del inmunógeno la puede hacer el experto en la materia sin demasiada experimentación.

40 **[0178]** Se inmunizan ratones, tales como Balb/c, con el inmunógeno emulsionado en adyuvante complejo de Freund, y se inyecta por vía subcutánea o intraperitoneal, en una cantidad de 1-100 microgramos. Alternativamente, el inmunógeno se emulsiona en adyuvante MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) y se inyecta en las almohadillas de las patas traseras de los animales. Después se refuerza a los ratones inmunizados 10 a 12 días después con inmunógeno adicional emulsionado en el adyuvante seleccionado. Después, durante varias semanas, también se puede reforzar a los ratones con inyecciones de inmunización adicionales. Se pueden obtener periódicamente muestras de suero de los ratones por sangrado retro-orbital para ensayar mediante ensayos ELISA para detectar los anticuerpos.

50 **[0179]** Después de detectar una titulación de anticuerpos adecuada, se puede inyectar a los animales "positivos" para los anticuerpos una inyección intravenosa final del ligando dado. De 3 a 4 días después, los ratones se sacrifican y se recogen las células del bazo. Después, las células del bazo se fusionan (usando polietilenglicol al 35%) con una línea celular de mieloma murino seleccionada, tal como P3X63AgU.1, disponible en ATCC, nº CRL 1597. Las fusiones generan células de hibridoma que después se pueden cultivar en placas de cultivo tisular de 96 pocillos que contienen medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) para inhibir la proliferación de células no fusionadas, híbridos de mieloma e híbridos de células de bazo.

[0180] Se cribará en las células del hibridoma en un ELISA, la reactividad frente al antígeno. La determinación de células de hibridoma "positivas" que secretan los anticuerpos monoclonales deseados frente a homólogos del

ligando de TIE en el presente documento, es conocido para el experto en la materia.

[0181] Las células de hibridoma positivas se pueden inyectar por vía intraperitoneal en ratones Balb/c singénicos para producir ascitis que contienen los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el ligando de TIE.

5 Alternativamente, las células de hibridoma se pueden cultivar en matraces de cultivo tisular o botellas giratorias. La purificación de los anticuerpos monoclonales producidos en el ascitis se puede llevar a cabo usando precipitación con sulfato amónico, seguido de cromatografía de exclusión en gel. Alternativamente, se puede usar cromatografía de afinidad basada en la unión del anticuerpo a la proteína A o proteína G.

10 EJEMPLO 4

Unión a células endoteliales

[0182] Las angiopoyetinas son factores secretados que regulan la angiogénesis por unión al receptor tirosina quinasa Tie2 específico de células endoteliales por su dominio de tipo fibrinógeno (FBN) N-terminal. Se encontró que el dominio superenrollado C-terminal presente en esta familia de ligandos secretados era necesario para la oligomerización del ligando (Procopio y col., *J. Biol. Chem.* 274: 30196-201 (1999)).

[0183] Similar a las angiopoyetinas, el Angptl3 es una glicoproteína secretada que consiste en un péptido señal N-terminal, seguido de un dominio superenrollado y un dominio de tipo FBN C-terminal (figura 3A).

[0184] Debido a las similitudes estructurales entre Angptl3 y las angiopoyetinas, se ensayó la capacidad de Angptl3 para unirse, en cultivo, a células endoteliales primarias que expresaban el receptor Tie2. Las células endoteliales microvasculares humanas (HMVEC), adquiridas en Cell System (Kirkland, WA), mantenidas en medio completo CS-C que contenía 10% de suero bovino fetal y mitógenos de acuerdo con las recomendaciones del proveedor, se incubaron con medio condicionado de células 293 transfectadas transitoriamente que expresan versiones marcadas con epítipo (gD) de los ligandos de Tie2 angiopoyetina 1 y 2 (Ang1 y Ang2), Angptl3, y proteína relacionada con angiopoyetina 1 (ARP1), respectivamente. ARP1 es una molécula estructuralmente relacionada que consiste en un dominio superenrollado y uno de tipo fibrinógeno pero incapaz de unirse a Tie2, y se usó como un control negativo. como se muestra en la figura 3B, Ang2 y Angptl3 se unen fuertemente a HMVEC en condiciones en las que no se observó unión para ARP1. Estos descubrimientos demostraban que la unión de Angptl3 a las células endoteliales era específica e implican la presencia de receptores en las células endoteliales que median la unión de Angptl3.

[0185] Para ensayar si Tie2, el receptor para angiopoyetinas 1, 2 y 3 (Ang1, Ang2, y Ang3), o Tie1, un receptor huérfano con alta homología de secuencia con Tie2, se unen a Angptl3, se llevaron a cabo experimentos de inmunoprecipitación usando células 293 transitoriamente con vectores de expresión para las versiones marcadas con epítipo (gD) de Ang1 y Ang2, Angptl3 y ARP1 junto con construcciones del receptor de longitud completa para Tie1 y Tie2, respectivamente. Los extractos de células completas se prepararon por lisis en tampón de RIPA (1xPBS; NP40 al 1%; desoxicolato sódico al 0,5%; SDS al 0,1%; PMSF, 100 mg/ml; aprotinina, 30 ml/ml; ortovanadato sódico, 1 mM) que contenía inhibidores de proteasa recién añadidos. El extracto se incubó con anticuerpos específicos para Tie1 o Tie2 (Santa Cruz Biotechnology, San Diego, CA) y el inmunoprecipitado resultante se analizó por SDS-PAGE e inmunotransferencia. Específicamente, las proteínas resueltas por SDS-PAGE y transferidas a membrana de PVDF se incubaron con anticuerpos contra el marcador gD o los receptores Tie, respectivamente. Como se muestra en la figura 4, Tie1 y Tie2 no se unían a Angptl3 en condiciones experimentales que permitían que Tie2 se uniera a Ang1 y Ang2. Estos descubrimientos demostraron que Angptl3 no es ni un ligando para Tie2 ni para Tie1 y sugerían la presencia de otros receptores en las células endoteliales que median la fuerte unión observada en los experimentos de unión celular.

[0186] Es interesante, que la exposición de células a hipoxia o VEGF, imitando las condiciones "de tipo tumoral", aumentaron significativamente la unión de Angptl3 (no se muestran los datos). Se encontró previamente que estas condiciones inducían la expresión de integrina en las células endoteliales (Suzuma y col., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39:1028-35 (1999)), mientras que no se encontró alteración de los niveles de los receptores Tie1 y Tie2 (Mandriota y Pepper, *Circ. Res.* 83:852-9 (1998) y Oh y col., *J. Biol. Chem.* 274: 15732-9 (1999)).

55 EJEMPLO 5

Modelado molecular de FBN-Angptl3

[0187] El dominio de tipo FBN del Angptl3 comparte una identidad de secuencia de 39,6% con el extremo C de la cadena y del fibrinógeno humano. Para investigar la función biológica y los mecanismos moleculares por los que Angptl3 se une a las células endoteliales, se construyó un modelo del dominio de tipo FBN de Angptl3, usando la información estructural proporcionada por los estudios cristalográficos de rayos X sobre los dominios de FBN y técnicas de modelado de homología. El dominio de FBN tiene un plegado único que consiste en tres dominios bien definidos: un dominio en el extremo N formado por una lámina β de dos cadenas antiparalelas flanqueada por una hélice corta; un dominio central formado por una lámina β de 5 cadenas antiparalelas con dos hélices cortas y un bucle en horquilla alineados frente a una de sus caras; y un tercer dominio que está compuesto predominantemente de bucles (figura 5B).

10

[0188] Para construir el modelo de FBN-Angptl3, se llevó a cabo un alineamiento de secuencia-estructura entre la secuencia de FBN-Angptl3 y varias estructuras del dominio de FBN usando clustalW (Thompson y col., *Nucleic Acids Res.*, 22:4673-80 (1994)) y Threading (ProCeryon Biosciences Inc.). A partir de este alineamiento se eligió 3FB (código de PDB) como estructura molde para la construcción del modelo. Se usó el programa PROCHECK (Laskowski y col., *J. Biomol. NMR* 8:477-86 (1996)) para evaluar la calidad geométrica del modelo que estaba por encima de la calidad estereoquímica promedio cuando se comparaba con las bases de datos de referencia de estructuras depositadas en la PDB. El modelo de FBN-Angptl3 final tenía una r.m.s.d. de 1,95 Å para todos los átomos C_{α} cuando se comparaba con el molde. El plegado total del dominio de FBN se conserva en FBN-Angptl3, con algunas diferencias en las regiones bucle de las posiciones de aminoácidos 220-224, 289-306 y 357-363 (Figuras 5A y B).

[0189] Los estudios de la cadena gamma del fibrinógeno humano condujeron a la identificación de dos regiones implicadas en la unión a la integrina $\delta M\beta 2$, una integrina expresada predominantemente en leucocitos (Ugarova y col., *J. Biol. Chem.* 273:22519-27 (1998)). Ambas regiones, separadas en términos de secuencia de aminoácidos lineal, forman dos cadenas β adyacentes antiparalelas en la estructura tridimensional del dominio de FBN (P1, restos 190-202; P2, restos 377-395). También se ha encontrado que una región diferente dentro de la cadena gamma del fibrinógeno (P3, 346-358) y tenasina-C están implicados en la unión a la integrina $\alpha\beta 3$ (Yokoyama y col., *J. Biol. Chem.* 275:16891-8 (2000)). El presente modelo de FBN-Angptl3 y el dominio de FBN de la cadena gamma del fibrinógeno humano, comparten un alto grado de similitud estructural en esas regiones (P1: 38-50; P2: 199-214; P3: 346-361) (Figura 5A), donde la numeración sigue la numeración de 3FIB (código de PDB). Siguiendo la numeración de aminoácidos de Angptl3 (SEQ ID NO: 2), P1 corresponde a los aminoácidos 281-293 (SEQ ID NO: 14); P2 corresponde a los aminoácidos 442-460 (SEQ ID NO: 15); y P3 corresponde a los aminoácidos 415-430 (SEQ ID NO: 17) en la secuencia de aminoácidos de la proteína madura.

[0190] Con el fin de ensayar la hipótesis de si las regiones dentro del dominio de tipo FBN de Angptl3 eran responsables de la unión, se diseñaron y sintetizaron varios péptidos (Tabla 2). Las secuencias P3 codifican las regiones con la mayor diversidad estructural entre los diferentes dominios y por lo tanto pueden determinar la especificidad del receptor. Varios péptidos desordenados e invertidos derivados de las mismas regiones se usaron como péptidos de control (tabla 2). La proteína Angptl3 humana recombinante marcada con un epítipo gD amino terminal se generó usando un sistema de expresión de baculovirus como se describe en el ejemplo 2 (figura 6A).

[0191] El estado de glicosilación del Angptl3 recombinante se determinó por tratamiento con PNGasa-F de acuerdo con las instrucciones del fabricante (New England Biolabs, MA). La proteína purificada (50 ng) se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (Tris-Glicina al 10%, Invitrogen, CA) y se electrotransfirió a membranas de nitrocelulosa (Invitrogen, CA) usando procedimientos estándar. La membrana se bloqueó por incubación en leche en polvo desnatada instantánea al 5% p/v en PBS y se incubó durante la noche a 4°C con anticuerpo monoclonal dirigido contra gD 1 mg/ml (clon 5B6.K6) en tampón de bloqueo. Las membranas se lavaron con PBS/Tween 20 al 0,05% y posteriormente se incubaron con peroxidasa de rábano picante acoplada con anticuerpos de burro dirigidos contra ratón (Jackson ImmunoResearch Laboratories, PA) durante 1 h a temperatura ambiente. La proteína Angptl3 se visualizó por detección quimioluminiscente de acuerdo con el protocolo del fabricante (Amersham Pharmacia Biotech, NJ). Los análisis de inmunoprecipitación, transfecciones transitorias y FACS se llevaron a cabo como se ha descrito previamente (Klein y col., *Nature* 387:717-21 (1997)).

[0192] La disminución de movilidad en la banda de Angptl3 tras incubación con PNGasa indicaba que la proteína recombinante estaba glicosilada (figura 6C). Se hicieron observaciones similares previamente para las angiopoyetinas. Como se demuestra en la figura 7A, la adición de los tres péptidos al ensayo de adhesión bloqueaba completamente la unión de las células endoteliales a Angptl3. La integrina $\alpha\beta 3$ es capaz de reconocer algunos de sus ligandos en el contexto de la secuencia adhesiva de RGD. En apoyo de las observaciones de los autores de la invención de que el dominio de tipo fibrinógeno de Angptl3 no codifica dicha secuencia de RGD, la

adición de péptidos RGD anuló solo parcialmente la adhesión de HMVEC, mientras que los péptidos RGE no tuvieron efecto. Este resultado sugería que solo una parte de la interacción de Angptl3 con $\alpha\beta 3$ es mediada de una forma dependiente de RGD. En conclusión, estos datos sugieren que las tres regiones dentro del dominio de tipo FBN de Angptl3 son parte del sitio de unión del receptor.

5

Tabla 2

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO
14NL6_P1*	PWTLIQHRIDGSQ	14
NL6_PP1	PWTLIQHRIDGSQ	14
NL6_P2*	YSIKSTKMLIHPTDSESFE	15
NL6_PP2	YSIKSTKMLIHPTDSES	16
NL6_P3*	GKYNKPRAKSKPERRR	17
NL6_PP3	GKYNKPRAKSKPER	18
NL6_P32	GKYNKPRAKSKPE	19
Nombre del péptido de control	Secuencia	SEQ ID NO
NL6_PP1_inv	QSGDIRHQILTWP	20
NL6_PP1_src	PQWSTGLDIQRH	21
NL_PP2_inv	SESDTPHILMKTISKISY	22
NL_PP2_src	YSSEISKDSTTPKHMIL	23
NL6_PP3_inv	REPKSKARPKNYKG	24
NL6_PP3_src	GRKEYPNKKSPKRA	25
FBG_P1	GWTVFQKRLDGSV	26
FBG_P2	YSMKKTTMKIIPFNRL	10
FBG_P3	GVYYQGGTYSKAS	12

EJEMPLO 6

10

Ensayos de adhesión celularA. Identificación de la adhesión celular de Angptl3 mediada por integrina

15 **[0193]** Con el fin de identificar potenciales integrinas que se unen a Angptl3, las proteínas Angptl3 recombinantes se aplicaron como recubrimiento sobre placas de microvaloración de fondo plano de 96 pocillos (MaxiSorp, Nunc, Dinamarca) durante la noche a 4°C y se bloquearon con BSA 100 $\mu\text{g/ml}$ en PBS durante 1 h a 37°C. Se ensayó en diferentes líneas de células 293 establemente transfectadas con diferentes heterodímeros de integrinas, incluyendo 1b11a ($\alpha\text{IIb}\beta 3$), $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 1$ y $\alpha\beta 5$, su capacidad de unión a las placas recubiertas con Angptl3. Las células se
20 recogieron y se diluyeron a 10^5 células/ml en medio CS-C exento de suero que contenía BSA al 1%, CaCl_2 1 mM y MgCl_2 1 mM. Las células se preincubaron con o sin anticuerpos o péptidos de bloqueo durante 15 min a 37°C y después se estimularon con PMA 200 nM. Se añadieron suspensiones celulares (10^4 células/pocillo) a los pocillos recubiertos y las placas se incubaron a 37°C durante los tiempos seleccionados. Las células no adherentes se separaron por lavados con PBS y se midió la unión de las células usando el procedimiento de PNAG de Lanndegren
25 (Landegren, U., *J. Immunol. Methods*, 67:379-388 (1984)). Los resultados se expresan como valores medios de DO_{405} de pocillos por triplicado.

[0194] Entre las líneas de células estables ensayadas, las células que expresaban $\alpha\beta 3$ presentaban un aumento notable de adherencia a Angptl3 comparado con otras líneas celulares (figura 7B). Por lo tanto, estos
30 descubrimientos demuestran que Angptl3 humano recombinante se une específicamente a la integrina $\alpha\beta 3$. Esto está de acuerdo con observaciones previas de que las células endoteliales expuestas a hipoxia y VEGF se unían de forma más eficaz a Angptl3.

B. Mediación de la adhesión celular de Angptl3 por $\alpha\beta 3$

35

[0195] Se sabe que las integrinas inducen respuestas biológicas, tales como la adhesión y migración, tras activación por sus ligandos. Se diseñaron experimentos para ensayar si Angptl3 ejerce dichos efectos en células endoteliales humanas primarias, y si $\alpha\beta 3$ era suficiente para mediar estas respuestas. Cuando se ensayó en el ensayo de adhesión de células endoteliales, Angptl3 indujo una adhesión dependiente de la dosis, fuerte, en el
40 transcurso de 4 horas después de incubación (figura 7C). Los niveles observados eran comparable a los niveles

obtenidos cuando las células se cultivaron en placa sobre vitronectina, el ligando prototípico para $\alpha\beta 3$ (no se muestran los datos).

[0196] Para determinar si la integrina $\alpha\beta 3$ era suficiente para mediar la adhesión celular de Angptl3, se ensayó la capacidad de anticuerpos de bloqueo o péptidos inhibidores para inhibir la adhesión en el ensayo de adhesión celular. Se añadieron anticuerpos de bloqueo de función a las células endoteliales antes de incubación con pocillos recubiertos de Angptl3. La presencia de anticuerpos de bloqueo de función contra $\alpha 5\beta 1$ o $\alpha\beta 5$ no impartió adhesión de HMVEC a las placas de cultivo recubiertas con Angptl3 (20 mg/ml), sin embargo, el anticuerpo específicos de $\alpha\beta 3$ bloqueó completamente la adhesión (figura 7D). Como control general, se añadió EDTA (10 mM) que anula la unión de la integrina a sus ligandos, al experimento de unión. Como se muestra en la figura 7D, la interferencia con la dependencia de integrinas en cationes divalentes abolió completamente la adhesión a células endoteliales.

EJEMPLO 7

15 Ensayo de migración celular

[0197] Puesto que otra característica de la actividad de las integrinas en las células endoteliales son sus respuestas migratorias a la estimulación de ligando, se desarrolló un ensayo de migración para permitir el estudio de los efectos de Angptl3 en la inducción de la migración de células endoteliales.

[0198] Se ensayó Angptl3 en el ensayo de migración, descrito por T.V. Byzova y col., *Exp. Cell Res.*, 254:299-308 (2000). En ensayo de migración usa insertos de cultivo tisular de multipocillos HTS con tamaño de poros de 8 μm (Becton Dickinson, NJ). La proteína Angptl3 se diluyó en PBS a 50 ng/ μl y se usó para recubrir con una capa la superficie del filtro de membrana. Después del recubrimiento previo con BSA/PBS al 3%, los filtros se pusieron en 500 μl de medio CS-C exento de suero, BSA al 1%, CaCl_2 1 mM. Las HMVEC se lavaron 3 veces con PBS, se recogieron y se suspendieron hasta 10^5 células/ml en medio exento de suero complementado como se ha descrito antes. Las células se preincubaron con o sin anticuerpos de bloqueo (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 15 min a 37°C antes de la estimulación con PMA (200 nM). La suspensión celular (250 μl) se añadió a la cámara superior y se dejó que las células migraran durante la noche a 37°C en un incubador humidificado con CO_2 al 5%. Después de incubación, las células que quedaban en la parte superior de los pocillos se retiraron usando una torunda, y las células que habían migrado a la superficie inferior de la membrana se fijaron con metanol y se tiñeron con yoduro YO-PRO-1 (Molecular Probes). Los resultados de la migración se cuantificaron como el número medio de células/campo microscópico usando el software *Openlab* (Improvision, MA).

[0199] Después de 16 a 20 h de exposición de Angptl3 a células endoteliales, se observó un aumento de 2,5 veces en la migración celular comparado con el tratamiento de control con BSA (figura 7E). Lo que es más importante, dicha migración se bloqueó por la administración de un anticuerpo antagonista contra $\alpha\beta 3$, pero no por anticuerpos de control que bloquean otras integrinas. En conclusión, Angptl3 induce de forma potente la migración de células endoteliales humanas primarias y ambas actividades eran bloqueadas por anticuerpos antagonistas contra $\alpha\beta 3$.

EJEMPLO 8

Expresión tisular de Angptl3

A. Hibridación in situ

[0200] La hibridación in situ se llevó a cabo como se ha descrito previamente (Lu, *Cell Vision* 1:169-176 (1994)). Se diseñaron los cebadores de la PCR

[0201] superior: 5' promotor T7: GGATTCTAATACGACTCACT ATAGGGC (SEQ ID NO: 6) + GGCATTCTGCTGAATGTACC (secuencia específica de hAngptl3, SEQ ID NO: 7) 3', e inferior: 5' promotor T3: CTATGAAATT AACCTCACTAAAGGGA (SEQ ID NO: 8) + ACCACACTCATCATGCCACCA (secuencia específica de hAngptl3, SEQ ID NO: 9) 3', para amplificar un fragmento de 506 pb de Angptl3 humano y

[0202] superior: 5' promotor T7: GGATTCTAATACGACTCACTATAGGGC (SEQ ID NO: 6) + 5' GATGACCTTCCTGCCGACTG (secuencia específica de mAngptl3, SEQ ID NO: 11) 3', e inferior: promotor T3: CTATGAAATTAACCTCACTAAAGGGA (SEQ ID NO: 8) + 5' GTCATTCCACCACAGCCA (secuencia específica de mAngptl3, SEQ ID NO: 13). Los cebadores incluían extensiones que codifican 27 nucleótidos de ARN polimerasa

T7 o T3 de inicio situadas para permitir la transcripción in vitro de ribosondas del mismo sentido o de sentido contrario, respectivamente, a partir de productos amplificados. Se desparafinaron secciones de tejido humano de 5 µm de grosor, se desproteinizaron en proteinasa K 20 µg/ml durante 15 min a 37°C, se lavaron en 2 x SSC, se deshidrataron por concentraciones de etanol escalonadas y se incubaron en tampón de prehibridación 1-4 h. Los tejidos de ratón se digirieron en proteinasa K 4 µg/ml durante 30 min a 37°C y se trataron como se ha descrito antes. Las sondas del mismo sentido y sentido contrario marcadas con ³³P-UTP hibridaron con las secciones a 55°C durante la noche. Se separó la sonda no unida por incubación en RNasaA 20 mg/ml durante 30 min a 37°C, seguido de un lavado de alta restricción a 55°C en 0,1 x SSC durante 2 h y deshidratación por concentraciones escalonadas de etanol. Los portaobjetos se sumergieron en emulsión de rastreo nuclear NBT2 (Eastman Kodak, NY), se expusieron en cajas de portaobjetos de plástico selladas que contenían desecante durante 4 semanas a 4°C, se revelaron y se contratiñeron con hematoxilina y eosina.

[0203] Como se muestra en la figura 8C, se observó expresión específica en hepatocitos en las secciones de hígados embrionarios de embriones de ratón E15 y E18. No había expresión de Angptl3 en progenitores eritroides, células endoteliales o megacariocitos en las secciones embrionarias analizadas.

B. Transferencias Northern

[0204] Con el fin de estudiar la expresión de Angptl3 en tejidos humanos adultos, se hibridaron transferencias Northern de multitejidos con una sonda radiomarcada que cubría el extremo 5' de la secuencia codificante, descrita antes. En contraste con la observación previa con el Angptl3 ortólogo murino (Conklin y col., *Genomics* 62:477-82 (1999)), que se encontró que era expresado exclusivamente en el hígado, la expresión de Angptl3 humano se encontró en hígado y riñón adultos, sin embargo, las señales observadas en el riñón eran significativamente menores (figura 8A). No se encontró expresión en ninguno de los otros tejidos adultos analizados, incluyendo el pulmón y cerebro, con excepción de algunas señales débiles en el tejido del músculo esquelético. La localización celular de la expresión del ARNm de Angptl3 se investigó por experimentos de hibridación in situ en diferentes tejidos normales y enfermos obtenidos de muestras humanas y de ratón. Los tejidos incluían todos los órganos principales, médula ósea, así como tejidos de hígado patológico tales como de cirrosis, adenocarcinomas hepáticos metastáticos y secciones de casos de hepatotoxicidad inducida por acetaminofeno. Como se muestra en la figura 8B, se encontró algo de expresión de fondo en el hígado adulto normal, confirmando los datos de la transferencia Northern. Aunque no había alteraciones en la expresión en las muestras de tumor hepático analizadas, se observó una fuerte inducción en secciones obtenidas de hígado enfermo asociado con inflamación, tal como cirrosis hepática y después lesión tóxica. Como se muestra en los añadidos de gran aumento, la expresión específica en hepatocitos se encontró tanto en tejidos de hígado normal como enfermo (figura 8C). No se detectó expresión en células del estroma, en linfocitos ni en células endoteliales en o alrededor de los tejidos enfermos.

[0205] En resumen, estos datos demuestran un patrón de expresión específico de hepatocitos para Angptl3 durante el desarrollo embrionario así como una fuerte regulación por aumento específica en hepatocitos en diferentes casos de hígado enfermo asociado con inflamación.

C. Perfil de expresión génica

[0206] Se llevó a cabo el análisis de expresión génica para Angptl3 usando la base de datos GeneLogic de tejidos humanos que representan estados normales y enfermos, incluyendo cáncer y no cáncer.

[0207] Usando la base de datos de expresión génica GeneLogic, se confirmó la expresión aumentada en condiciones de enfermedades hepáticas identificada por hibridación in situ de secciones de hígado humano (figura 8B). Los niveles basales de Angptl3 eran bajos en la mayoría de tejidos y órganos, con excepción del hígado. Había un aumento significativo de los niveles de expresión de Angptl3 entre estados normales y patológicos en el hígado, corazón y tiroides. Un análisis de subtipos más detallado para la expresión de Angptl3 con muestras obtenidas de pacientes que padecían diferentes formas de enfermedades hepáticas, confirmó la expresión mayor de Angptl3 durante la cirrosis hepática. Es interesante que el análisis de base de datos de GeneLogic puso de manifiesto una fuerte inducción de la expresión de Angptl3 no solo en hígados patológicos, sino también en enfermedades cardiacas tales como enfermedades coronarias y cardiomiopatía hipertrófica. Las formas de enfermedad asociadas con niveles de expresión aumentados de Angptl3 comparten en común la formación de tejidos fibróticos que consisten en una variedad de proteínas de la matriz extracelular incluyendo colágeno, fibronectina, vitronectina y laminina, se sabe que todas estas moléculas del ECM se unen a formas de integrina específicas.

EJEMPLO 9

Ensayo para la actividad angiogénica in vivo de Angptl3

[0208] Con el fin de ensayar si Angptl3 era capaz de inducir una respuesta angiogénica in vivo en córnea de rata, se implantaron gránulos de Hyaluron que contenían Angptl3 murino y humano (500 ng) así como VEGF humano (100 ng), por separado o en combinación como se ha descrito previamente (Xin y col., *J. Biol. Chem.*, 274:99116-9121 (1999)). Se implantaron gránulos de Hydron que contenían excipiente (control), Angptl3 murino o humano (500 ng), VEGF (100 ng), o la combinación de Angptl3 humano o murino (500 ng) y VEGF (100 ng), en las córneas de ratas Sprague-Dawley macho de 250 a 300 g. Todos los gránulos de Hydron contenían 100 ng de sucralfato. El día 6 se sacrificó a los animales y se les inyectó fluoresceína-isotiocianato-dextrano para permitir la visualización de la vasculatura. Se hicieron montajes completos de las córneas de los ojos enucleados y se analizaron las zonas neovasculares usando un análisis de imagen asistido por ordenador (Image Pro-Plus 2.0, Silver Spring, MD). En contraste con los informes previos que se centraban en los efectos de la antiopoyetina 1 y 2 cuando se ensayaban en el ensayo de angiogénesis de la córnea (Asahara y col., *Circ. Res.* 83:233-40 (1998)), el Angptl3 recombinante solo indujo de forma potente una fuerte respuesta angiogénica 5 días después de la implantación del gránulo. Como se muestra en las figuras 9A y B, el Angptl3 murino era ligeramente más potente en inducir la angiogénesis cuando se comparó con la proteína humana recombinante, sin embargo, ambas respuestas eran comparables a los niveles obtenidos para el VEGF. En el tratamiento de combinación con VEGF, se observaron efectos aditivos pero no sinérgicos (figura 9B). Estos descubrimientos pueden reflejar las rutas de transducción de señales interdependientes usadas por ambos ligandos (Byzova y col., *Mol. Cell.* 6:852-60 (2000)).

EJEMPLO 10Actividad biológica in vivo de Angptl3

A. Efecto protector transitorio y efecto a largo plazo de la administración intravenosa e intradérmica de Angptl3

Métodos

[0209] Generación de adenovirus: se generaron CMV-gD-mAngptl3, CMV-lacZ y mVEGF164 adenovíricos usando el sistema de vector adenovírico AdEasy (Stratagene) siguiendo esencialmente las instrucciones del fabricante. Se construyeron vectores adenovíricos recombinantes que codifican Angptl3 o VEGF murino por clonación de la región codificante de Angptl3 o VEGF en el sitio policonector del kit de construcción de vector Ad-easy de Stratagene. La región codificante de mAngptl3 o VEGF se clonó entre los sitios NotI y HindIII del vector pShuttleCMV. Estos vectores, junto con el pShuttleCMV-lacZ suministrado, se combinaron en bacterias electrocompetentes BJ5183 (Stratagene), con el vector AdEasy que contenía el genoma Ad5 eliminado para las regiones E1 y E3. Se prepararon reservas víricas primarias por transfección transitoria de los plásmidos AdEasy recombinados en células huésped HEK293. Después las reservas de adenovirus se amplificaron más en células HEK293 y se purificaron usando el kit de purificación Virakit Adeno (Virapur). Las titulaciones de adenovirus se obtuvieron por ensayos en placa cubiertas con agarosa.

1. Efecto protector de la administración intravenosa de Angptl3 a corto plazo

[0210] Para el análisis a corto plazo de la protección del hígado frente a la lesión tóxica, se administraron construcciones adenovíricas a 12 ratones BalbC adultos por inyecciones en la vena de la cola que permiten la expresión continua y fuerte de proteína en los hígados tan pronto como de 2 días hasta 3 semanas después del tratamiento con una dosis de 1×10^9 ufp para mAngptl3 y el virus de control que codifica LacZ, y 1×10^7 ufp del virus que codifica VEGF. 5 días después de tratamiento con vectores adenovíricos, los ratones se subdividieron en dos subgrupos (n=6) que además se sometieron a tratamiento con: vehículo (aceite de oliva) o CCl₄ (tetracloruro de carbono), el potente agente hepatotóxico que induce daño hepático. Tanto el vehículo como el CCl₄ se dieron en una dosis de 4 ml/kg por alimentación oral con sonda. Después de 48 h, los animales se sacrificaron, se recogió la sangre y los tejidos se recogieron y se fijaron para el análisis. Los niveles de expresión de la construcción en los ratones se analizaron por análisis de transferencia Western el día 7 después de la infección adenovírica (figura 10A).

55 Resultados

[0211] El efecto protector de Angptl3 en necrosis de hepatocitos inducida por CCl₄ se demostró por la reducción significativa de 2,1 veces en los niveles en la sangre de la aspartato transferasa (AST), que es un indicador de insuficiencia hepática, en el suero de ratones tratados con el adenovirus que codifica Angptl3, pero no por ninguna

de las construcciones de control ($p < 0,0001$) (figura 10B). Por consiguiente, la administración transitoria de Angptl3 recombinante puede ser beneficiosa para el tratamiento de lesiones hepáticas.

2. Daño hepático inducido con expresión intravenosa prolongada de Angptl3

5

[0212] Con el fin de evaluar los efectos a largo plazo de los niveles de Angptl3 aumentados, los ratones que se trataron con vectores adenovíricos que codifican Angptl3 como se ha descrito antes, se caracterizaron durante un periodo de 2 semanas después de transducción vírica.

10 a. Análisis químico sanguíneo

[0213] Los niveles químicos sanguíneos indicativos de la función hepática se midieron en muestras de suero recogidas de ratones C57B16 genéticamente intactos, durante un periodo de 2 semanas después de transducción adenovírica. La hematología Cell-Cyn 13700 y los niveles químicos sanguíneos se determinaron en un Cobas
15 Integra 400.

[0214] Como se muestra en la figura 11A, los vectores adenovíricos que codifican Angptl3, pero no los virus de control que codifican LacZ o la angiopoyetina 1 (Ang1), indujeron un fuerte aumento de los niveles de ALT y AST en el suero. El aumento de los niveles de ALT y AST en el suero eran comparable a los niveles de ALT y AST que se observaron con el tratamiento con tetracloruro de carbono. Por consiguiente, la interferencia con la actividad de Angptl3 puede ser un potencial tratamiento durante enfermedades inflamatorias del hígado o enfermedades del corazón.
20

[0215] Con el fin de evaluar mejor una potencial contribución del sistema inmunitario, los niveles químicos sanguíneos indicativos de la función hepática se midieron en ratones que no expresaban RAG2 inmunocomprometidos, que carecen de linfocitos B y T, y ratones SCID que carecen de linfocitos B, T y citolíticos naturales (NK). Como se muestra en la figura 11B, los vectores adenovíricos que codifican Angptl3 inducían niveles de AST y ALT en ratones RAG2, sugiriendo que los cambios en la función hepática inducidos por Angptl3 se producen independientemente de la presencia de un sistema inmunitario intacto.
25

30

b. Proliferación de hepatocitos

[0216] Para caracterizar mejor el efecto del tratamiento con vectores adenovíricos que expresan Angptl3 en ratones que no expresan RAG2 y SCID, la proliferación celular en diferentes órganos con BrdU incorporado, fijados en formalina, incluyendo riñón, corazón, hígado, pulmón e intestino delgado de ratones tratados, se cuantificó en ratones que no expresan RAG2 y SCID que se habían tratado con vectores adenovíricos que expresan Angptl3 o vectores adenovíricos de control. Se midió la proliferación celular realizando la tinción con BrDU que detecta las células durante la fase S del ciclo celular en secciones insertadas en parafina, que se tomaron de los ratones de control o tratados con Angptl3, 14 días después de la administración adenovírica (IV). Se administró BrdU por vía intraperitoneal a los animales con una dosis de 100 mg/kg, 1 h después del sacrificio. Después de un tratamiento de 20 min con tripsina al 0,05% a 37°C y un tratamiento de 45 min con formamida al 95% en citrato trisódico 0,15 M a 70°C para la desnaturalización, los tejidos se tiñeron con anticuerpos de ratón contra IdU/BrdU (Caltag) con una dilución 1:1000 durante la noche a 4°C. Se usó un anticuerpo de caballo biotinilado contra IgG de ratón (Vector) como reactivo secundario y se detectó usando el kit Vectastin ABC Standard Elite (Vector Laboratories). Se usó isotipo de ratón (Zymed) como control negativo. Las secciones se contratiñeron con hematoxilina. Se contó el número total de núcleos marcados en 10 campos seleccionados aleatoriamente, independientes, usando un objetivo 40x. Cada campo cubría un área de 0,063 mm².
35
40
45

[0217] Como se muestra en la tabla 2, se observó una inducción mayor de 10 veces de la proliferación de hepatocitos en ratones que no expresan RAG2 y SCID que se habían tratado con vectores adenovíricos que expresan Angptl3.
50

Tabla 2: Tinción de BrDU aumentada en secciones de hígado de ratones que no expresan RAG2 y beige SCID tratados con Angptl3 con respecto al tratamiento de control, 14 días después de tratamiento

55

	ratones que no expresan RAG2	ratones beige Scid sin pelo
PBS	13,0±5,3	9,0±6,2
Ad-LacZ (1x10 ⁹ UFP)	3,5±1,3	3,3±1,7
Ad-Angptl3 (1x10 ⁹ UFP)	81,2±24,9	67,2±20,1

c. Análisis histológico

[0218] Se llevaron a cabo análisis histológicos de las secciones de hígado que se habían recogido de C57/B16 14 días después de infección con vectores adenovíricos. Se observó un aumento en la cifra mitótica, que es indicativo de la proliferación celular en hepatocitos e infiltrados inflamatorios, en las secciones de hígado que se habían aislado de ratones tratados con vectores adenovíricos que codifican Angptl3 comparado con hígados que se habían aislado de ratones de control que se habían tratado con vectores adenovíricos que codifican LacZ. Los hígados de los animales tratados con Angptl3 también eran significativamente más grandes que los hígados de los animales tratados con control.

d. Análisis de FACS

[0219] Aunque LFA1 y Mac-1 expresados en células inmunitarias no se unen a Angptl3 recombinante (Camenisch y col., 2002) cuando se ensayan por ensayos ELISA in vitro, otros miembros de la familia de integrinas que son expresados en células inmunitarias pueden estar implicados con Angptl3.

[0220] Con el fin de estudiar la posibilidad de que las células inflamatorias contribuyan al daño tisular observado en hígados de ratones tratados con vector adenovírico que expresa CCLF1, se determinó la cantidad de células sanguíneas periféricas por FACS para la presencia de diferentes linajes, teniendo para marcadores específicos del tipo de célula. No se detectaron diferencias significativas en las cantidades de progenitores (Sca1), linfocitos T (CD4 y CD8), linfocitos B (B220), macrófago (Gr1/Mac1) y células eritroides (Ter119) en ratones tratados con vector adenovírico que expresa Angptl3 cuando se compararon con las cantidades detectadas en ratones tratados con vectores adenovíricos de control que expresan LacZ o Ang1. De forma similar, no se observaron diferencias en la cantidad de glicéridos y colesterol en el suero entre los grupos de tratamiento.

e. Análisis de adhesión celular

[0221] Para investigar más el mecanismo celular implicado en mediar el daño hepático, se llevaron a cabo experimentos de adhesión celular con hepatocitos y células endoteliales en placas de cultivo tisular recubiertas con Angptl3, similares a los ensayos de adhesión celular descritos en el ejemplo 6.

[0222] Placas de fondo plano de 96 pocillos (MaxiSorp, Nunc, Dinamarca) se recubrieron durante la noche a 4°C con las concentraciones de proteínas indicadas y se bloquearon con BSA al 3% en PBS durante 1 h a 37°C. Se recogieron células endoteliales dérmicas humanas primarias (HMVEC) y hepatocitos murinos recién aislados que se prepararon a partir de hígados de ratones C57/B16 adultos usando el procedimiento descrito por LeCouter y col. (LeCouter y col., 2001), y se diluyeron a 10^5 células/ml en medio CS-C exento de suero que contenía BSA al 1%, CaCl_2 1 mM y MgCl_2 1 mM en presencia de PMA 200 nM. Se observaron resultados cualitativamente similares con respecto a la unión de células en ausencia de PMA. Se añadieron suspensiones celulares (10^4 células/pocillo) a los pocillos recubiertos y las placas se incubaron a 37°C durante los tiempos seleccionados. Las células no adherentes se eliminaron mediante lavados con PBS y se midió la unión celular usando el procedimiento de PNAG de Landegren (Landegren, 1984). Los resultados se expresaron como valores medios de DO_{405} de los pocillos por triplicado.

[0223] Como se muestra en la figura 13, la adhesión de HMVEC a placas recubiertas con Angptl3 era entre 20% y 50% con respecto al nivel de adhesión observado para placas recubiertas con fibronectina. También se observó la adhesión de hepatocitos dependiente de la concentración del recubrimiento. Por consiguiente, los hepatocitos y células endoteliales pueden estar implicados en mediar los efectos biológicos observados en el hígado de ratones tratados con Angptl3.

3. Permeabilidad vascular aumentada con administración intradérmica de Angptl3

[0224] Para estudiar los cambios vasculares inducidos por la expresión transitoria de Angptl3 en ratones adultos, se administraron vectores de expresión adenovíricos (1×10^9 UFP) en un volumen total de 10 μl en la capa de piel epidérmica de las orejas de ratones FVB adultos con anestesia, y después se analizaron los cambios en la permeabilidad vascular usando el ensayo de azul de Evans. Brevemente, los ratones se anestesiaron desde el principio y durante todo el ensayo de azul de Evans. Tras el inicio de la anestesia, se administraron por vía intravenosa 100 μl de azul de Evans (disolución al 1% en PBS) a los ratones por inyección en la vena de la cola. Después de un periodo de 60 min tras la administración del azul de Evans, los ratones se perfundieron desde el

ventrículo izquierdo con paraformaldehído al 1% en tampón de citrato a un pH de 3,5 y una presión de 120 mm de Hg. Se retiraron las orejas y se pesaron. El colorante azul de Evans se extrajo de las orejas con 1 ml de formamida. Se midió la cantidad de azul de Evans extravasada con un espectrofotómetro óptico a 610 nm y se expresó como el contenido de colorante por 1 mg de peso de tejido húmedo.

5

Resultados:

[0225] Se observó un aumento de la permeabilidad vascular que se midió por ensayo de azul de Evans con respecto a los niveles de permeabilidad vascular en ratones a los que se administraron vectores adenovíricos de control que expresaban LacZ, en las orejas de los ratones a los que se había administrado por vía intradérmica vectores adenovíricos que expresaban Angptl3 o VEGF (figura 12D), 6 días después de administración.

B. Permeabilidad vascular aumentada en ratones transgénicos que expresan K5-mAngptl3

[0226] En un procedimiento alternativo, los efectos en el desarrollo de los niveles aumentados de expresión de Angptl3 en la piel, se estudiaron generando ratones transgénicos que expresaban Angptl3 murino bajo el control de un promotor específico de queratinocitos, que es expresado de forma constitutiva durante el desarrollo y en adultos.

1. Ratones fundadores transgénicos

20

[0227] Se hicieron ratones fundadores transgénicos usando K5-gD-mAng5, una construcción que permite la expresión de Angptl3 bajo el control del promotor K5 murino, por procedimientos estándar (Filvaroff y col., 2002). Para generar la construcción K5-gDmAng5, el gen de Angptl3 gene se cortó *NotI-NotI* y se insertó en pNASSK5 β *NotI-NotI*-SAP produciendo K5-gD-mAng5.

25

[0228] Se generaron un total de 17 cepas de fundadores transgénicos. Se hizo el genotipo de las crías de ratones a los 9 días de edad por PCR del ADN de la cola del ratón (QIAGEN, Santa Clarita, CA) usando los siguientes grupos de cebadores:

[0229] gD-mAng5.311.F: ATATGCCTTGCGGATGC (SEQ ID NO: 32); y

[0230] gD-mAng5.578.R: ATGGACAAAATCTTTAAGTCCATGAC (SEQ ID NO: 33).

[0231] A las 8 semanas de edad, se tomaron biopsias de varios tejidos, incluyendo músculo, riñón, hígado, bazo, piel, cerebro, timo e intestino, y se sometieron a la RT-PCR en tiempo real para la determinación de los niveles de expresión endógenos y transgénicos de Angptl3. Para el análisis por RT-PCR, se usaron las siguientes sondas y cebadores que se diseñaron de modo que los transcritos endógenos y transgénicos eran medibles:

[0232] MMAng5.1165.FP: FAM-CTCCCAGAGCACACAGACCTGATGTTTT-TAMRA (SEQ ID NO: 34)

40

[0233] MMAng5.1144.F: GCTGGCAATATCCCTGGG (SEQ ID NO: 35)

[0234] MMAng5.1223.R: AGCTGTCCCTTGCTCTGTGA (SEQ ID NO: 36)

[0235] El análisis estadístico de las diferencias entre ratones transgénicos que expresan Angptl3 bajo el promotor K5 se determinó mediante la prueba t de Student con un valor de $P < 0,05$ considerado estadísticamente significativo y un valor de $P < 0,01$ como muy significativo.

2. Progenie de ratones transgénicos

50

[0236] Basándose en el análisis de expresión de genes de biopsias de piel de todos los ratones fundadores transgénicos, se identificaron los cinco fundadores de mayor expresión de Angptl3 y se seleccionaron para la cría posterior con ratones C57/B16. El análisis de frecuencias de genotipos puso de manifiesto la distribución de frecuencias Mendeliana normal de los transgenes y no se observó una letalidad posnatal significativa que estuviera asociada con la expresión de transgenes.

55

a. Expresión transgénica

[0237] Se aisló el ARN de diferentes tejidos indicados y se evaluaron los niveles relativos de expresión transgénica

con respecto a la expresión endógena, específicamente en el hígado, por RT-PCR en tiempo real.

[0238] Como se esperaba, se observaron niveles aumentados de expresión de Angptl3 murino en la piel de la camada transgénica frente a los correspondientes controles genéticamente intactos. La expresión transgénica de Angptl3 en la piel alcanzó aproximadamente 10% de los niveles de expresión de Angptl3 endógenos en el hígado (figura 12A).

[0239] Además, se observó la expresión moderada en el pulmón y el cerebro de los ratones transgénicos de 12 semanas de edad cuando se comparó con ratones genéticamente intactos. Por consiguiente, la expresión en el pulmón y el cerebro puede producir una mayor actividad transcripcional del promotor K5 en estos tejidos.

[0240] En apoyo de la expresión moderada de Angptl3 encontrada por el análisis de transferencia Northern en riñones humanos adultos (figura 8A), el análisis Taqman de ARN de riñón de ratón puso de manifiesto niveles de expresión endógenos moderados de Angptl3.

[0241] Con el fin de seguir la expresión transgénica posnatal a lo largo del tiempo, se llevó a cabo el análisis por RT-PCR en tiempo real, con ADN aislado de biopsias de piel de ratones transgénicos de 3, 6 y 11 semanas de edad. Como se muestra en la figura 12B, se observaron niveles constantes de expresión transgénica en la piel de ratones transgénicos en todas las etapas de desarrollo ensayadas.

b. Permeabilidad vascular

[0242] Basándose en los datos de expresión transgénica, se seleccionaron camadas transgénica y controles correspondientes genéticamente intactos de 12 semanas de edad, y se sometieron a un ensayo de permeabilidad vascular usando el ensayo de azul de Evans similar a como se ha descrito antes y previamente para Ang1 y Ang2, dos miembros estructuralmente relacionados de la familia de angiopoyetina de moléculas angiogénicas (Maisonpierre y col., 1997; Thurston y col., 2000; Thurston y col., 1999). La permeabilidad vascular se midió por el ensayo de azul de Evans como se ha descrito antes. Ambas cepas transgénicas de 11 semanas de edad que se sometieron al análisis de azul de Evans tenían un aumento significativo, aumento de entre 2 y 3 veces, en la permeabilidad vascular en niveles basales (figura 12C) cuando se compararon con las cepas genéticamente intactas de la camada correspondiente. Sin embargo, las diferencias de permeabilidad vascular entre los ratones transgénicos y los ratones genéticamente intactos de la camada correspondiente eran menos significativos cuando los ratones se estimularon con aceite de mostaza antes de someterlos al análisis del ensayo de azul de Evans. Por consiguiente, el aumento de la permeabilidad vascular en ratones transgénicos con respecto a sus controles de la camada genéticamente intactos puede sugerir una función de Angptl3 en la regulación de la permeabilidad vascular.

Depósito de material

[0243] Como se ha indicado antes, los siguientes materiales se han depositado en la American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, EE.UU. (ATCC):

Material	Nº de depósito en ATCC	Fecha del depósito
Angptl3-DNA16451-1078	209281	9/18/97

[0244] Estos depósitos se hicieron en virtud de las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en Materia de Patentes (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años desde la fecha del depósito. El depósito se hará disponible por la ATCC bajo los términos del Tratado de Budapest, y estará sujeto a un acuerdo entre Genetech Inc. y la ATCC, que asegure la disponibilidad permanente y sin restricción de la progenie del cultivo del depósito al público tras la concesión de la patente de EE.UU. pertinente o tras abrir a consulta por el público cualquier solicitud de patente de EE.UU. o extranjera, lo que ocurra primero, y asegure la disponibilidad de la progenie a uno determinado por el Comisionado de EE.UU. de Patentes y Marcas para tener derecho a la misma de acuerdo con 35 USC § 122 y las reglas del Comisionado conforme a ellas (incluyendo 37 C.F.R. §1.14 con particular referencia a 886 OG 683).

[0245] El concesionario de la presente solicitud ha acordado que si un cultivo de los materiales en depósito muriera, se perdiera o destruyera cuando se cultiva en condiciones adecuadas, los materiales serán sustituidos inmediatamente al notificarlo, por otros de los mismos. La disponibilidad del material depositado no debe considerarse como una licencia para la práctica de la invención en contravención de los derechos garantizados bajo

la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes de patentes.

- [0246]** La presente memoria descriptiva se considera que es suficiente para permitir que el experto en la materia ponga en práctica la invención. La presente invención no está limitada en su alcance por la construcción depositada, 5 puesto que la realización depositada se pretende que sea solo una ilustración de determinados aspectos de la invención, y cualquier construcción que sea funcionalmente equivalente está dentro del alcance de la invención. El depósito del material del presente documento no constituye la admisión de que la descripción escrita es inadecuada para permitir la práctica de cualquier aspecto de la invención, incluyendo el mejor modo de la misma, ni debe considerarse como limitante del alcance de las reivindicaciones a las ilustraciones específicas que representa. 10 Realmente, diferentes modificaciones de la invención además de las mostradas y descritas en el presente documento, serán evidentes para el experto en la materia a partir de la descripción anterior.

LISTADO SE SECUENCIAS

15 **[0247]**

<110> Genentech, Inc. Ferrara, Napoleone Gerber, Hans-Peter Kowalski, Joe Pisabarro, Maria Teresa Sherman, Daniel Eric

20 <120> COMPOSICIÓN QUE COMPRENDE Y PROCEDIMIENTO DE USO DEL FACTOR ANGIOGÉNICO PROTEÍNA DE TIPO ANGIOPOYETINA 3 ANGPTL3

<130> GENENT.086VPC

25 <150>

<151>

<160> 36

30 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 2042

<212> ADN

35 <213> Homo sapiens

<400> 1

```

gcgagcgcgt ggggtgaaatt gaaaatcaag ataaaaatgt tcacaattaa gctccttctt 60
tttattgttc ctctagttat ttctccaga attgatcaag acaattcatc atttgattct 120
ctatctccag agccaaaatc aagatttgct atgttagacg atgtaaaaat tttagccaat 180
ggcctccttc agttgggaca tggctcttaa gactttgtcc ataagacgaa gggccaaatt 240
aatgacatat ttcaaaaact caacatattt gatcagtctt tttatgatct atcgctgcaa 300
accagtgaaa tcaaagaaga agaaaaggaa ctgagaagaa ctacatataa actacaagtc 360
aaaaatgaag aggtaaagaa tatgtcactt gaactcaact caaaacttga aagcctccta 420
gaagaaaaaa ttctacttca acaaaaagtg aatatattag aagagcaact aactaactta 480
attcaaaatc aacctgaaac tccagaacac ccagaagtaa cttcacttaa aacttttgta 540
gaaaaacaag ataatagcat caaagacctt ctccagaccg tggaagacca atataaacia 600
ttaaccaac agcatagtca aataaaagaa atagaaaatc agctcagaag gactagtatt 660
caagaacca cagaaatttc tctatcttcc aagccaagag caccaagaac tactcccttt 720
cttcagttga atgaaataag aatgtaaaa catgatggca ttctgctga atgtaccacc 780
atataaaca gaggtgaaca tacaagtggc atgtatgcca tcagaccag caactctca 840
gttttctatg tctactgtga tgttatatca ggtagtccat ggacattaat tcaacatcga 900
atagatggat cacaaaactt caatgaaacg tgggagaact acaaatatgg ttttgggagg 960
cttgatggag aattttggtt gggcctagag aagatatact ccatagtgaa gcaatcta 1020
tatgttttac gaattgagtt ggaagactgg aaagacaaca aacattatat tgaatattct 1080
ttttacttgg gaaatcacga aaccaactat acgctacatc tagttgcat tactggcaat 1140
gtccccaatg caatcccgga aaacaaagat ttgggtgttt ctacttggga tcacaaagca 1200
aaaggacact tcaactgtcc agaggggtat tcaggaggct ggtggtggca tgatgagtgt 1260
ggagaaaaca acctaaatgg taaatataac aaaccaagag caaaatctaa gccagagagg 1320
agaagaggat tatcttggaa gtctcaaaat ggaagggtat actctataaa atcaacaaa 1380
atgttgatcc atccaacaga ttcagaaagc tttgaaatgaa ctgaggcaat ttaaaggcat 1440
atttaacat taactcattc caagttaatg tggctctaata atctggtata aatccttaag 1500
agaaagcttg agaaatagat tttttttatc ttaaagtcac tgtctattta agattaaaca 1560
tacaatcaca taaccttaaa gaatacgtt tacatttctc aatcaaaatt cttataatac 1620
tatttgtttt aaattttgtg atgtgggaat caattttaga tggtcacaat ctgattata 1680
atcaataggt gaacttatta aataactttt ctaaataaaa aatttagaga cttttatttt 1740
aaaaggcatc atatgagcta atatcacacac tttcccagtt taaaaaacta gtactcttgt 1800
taaaactcta aacttgacta aatacagagg actggtaatt gtacagttct taaatgttgt 1860
agtattaatt tcaaaaactaa aaatcgtcag cacagagtat gtgtaaaaat ctgtaataca 1920
aatttttaaa ctgatgcttc attttgctac aaaataattt ggagtaaatg tttgatatga 1980

tttatttatg aaacctaatg aagcagaatt aaatactgta ttaaaataag ttcgctgtct 2040
tt 2042

```

<210> 2

<211> 460

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Phe Thr Ile Lys Leu Leu Leu Phe Ile Val Pro Leu Val Ile Ser
 1 5 10 15
 Ser Arg Ile Asp Gln Asp Asn Ser Ser Phe Asp Ser Leu Ser Pro Glu
 20 25 30
 Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala Asn
 35 40 45
 Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu Lys Asp Phe Val His Lys Thr
 50 55 60
 Lys Gly Gln Ile Asn Asp Ile Phe Gln Lys Leu Asn Ile Phe Asp Gln
 65 70 75 80
 Ser Phe Tyr Asp Leu Ser Leu Gln Thr Ser Glu Ile Lys Glu Glu Glu
 85 90 95
 Lys Glu Leu Arg Arg Thr Thr Tyr Lys Leu Gln Val Lys Asn Glu Glu
 100 105 110
 Val Lys Asn Met Ser Leu Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu Ser Leu Leu
 115 120 125
 Glu Glu Lys Ile Leu Leu Gln Gln Lys Val Lys Tyr Leu Glu Glu Gln
 130 135 140
 Leu Thr Asn Leu Ile Gln Asn Gln Pro Glu Thr Pro Glu His Pro Glu
 145 150 155 160
 Val Thr Ser Leu Lys Thr Phe Val Glu Lys Gln Asp Asn Ser Ile Lys
 165 170 175
 Asp Leu Leu Gln Thr Val Glu Asp Gln Tyr Lys Gln Leu Asn Gln Gln
 180 185 190
 His Ser Gln Ile Lys Glu Ile Glu Asn Gln Leu Arg Arg Thr Ser Ile
 195 200 205
 Gln Glu Pro Thr Glu Ile Ser Leu Ser Ser Lys Pro Arg Ala Pro Arg
 210 215 220
 Thr Thr Pro Phe Leu Gln Leu Asn Glu Ile Arg Asn Val Lys His Asp
 225 230 235 240
 Gly Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr
 245 250 255
 Ser Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val
 260 265 270
 Tyr Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg
 275 280 285
 Ile Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr
 290 295 300
 Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile
 305 310 315 320
 Tyr Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu
 325 330 335
 Asp Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly
 340 345 350
 Asn His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn
 355 360 365
 Val Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp
 370 375 380
 Asp His Lys Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly
 385 390 395 400
 Gly Trp Trp Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys
 405 410 415

 Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Lys Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu
 420 425 430
 Ser Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys
 435 440 445
 Met Leu Ile His Pro Thr Asp Ser Glu Ser Phe Glu
 450 455 460

<210> 3
<211> 20
<212> ADN
5 <213> Homo sapiens

<400> 3

ccacgtggc ttgaaattga 20
10
<210> 4
<211> 50
<212> ADN
<213> Homo sapiens
15
<400> 4

cctccagaat tgatcaagac aattcatgat tgattctct atctccagag 50

20 <210> 5
<211> 19
<212> ADN
<213> Homo sapiens
25 <400> 5

tcgtctaaca tagcaaatc 19

<210> 6
30 <211> 27
<212> ADN
<213> Bacteriófago

<400> 6
35 ggattctaatt acgactcact atagggc 27

<210> 7
<211> 21
40 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 7

45 ggcattcctg ctgaatgtac c 21

<210> 8
<211> 27
<212> ADN
50 <213> Bacteriófago

<400> 8

ctatgaaatt aaccctcact aaagggg 27
55
<210> 9
<211> 21

ES 2 429 034 T3

<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 9

5 accacactca tcatgccacc a 21

<210> 10

<211> 16

10 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

15 Tyr Ser Met Lys Lys Thr Thr Met Lys Ile Ile Pro Phe Asn Arg Leu
1 5 10 15

<210> 11

<211> 20

<212> ADN

20 <213> Murino

<400> 11

gatgaccttc ctgccgactg 20

25

<210> 12

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 12

Gly Val Tyr Tyr Gln Gly Gly Thr Tyr Ser Lys Ala Ser
1 5 10

35 <210> 13

<211> 19

<212> ADN

<213> Murino

40 <400> 13

gtcattccac caccagcca 19

<210> 14

45 <211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

50

Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg Ile Asp Gly Ser Gln
1 5 10

<210> 15

ES 2 429 034 T3

<211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 15

Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys Met Leu Ile His Pro Thr Asp Ser Glu
 1 5 10 15
 Ser Phe Glu

<210> 16
 10 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 16

Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys Met Leu Ile His Pro Thr Asp Ser Glu
 1 5 10 15
 Ser

15

<210> 17
 <211> 16
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 17

Gly Lys Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Lys Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg
 1 5 10 15

25

<210> 18
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 18

Gly Lys Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Lys Ser Lys Pro Glu Arg
 1 5 10

35 <210> 19
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <400> 19

Gly Lys Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Lys Ser Lys Pro Glu
 1 5 10

<210> 20
 45 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 429 034 T3

<400> 24

Arg Glu Pro Lys Ser Lys Ala Arg Pro Lys Asn Tyr Lys Gly
1 5 10

5 <210> 25

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Péptido que comprende la secuencia humana desordenada.

<400> 25

Gly Arg Lys Glu Tyr Pro Asn Lys Lys Ser Pro Lys Arg Ala
1 5 10

15

<210> 26

<211> 13

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 26

Gly Trp Thr Val Phe Gln Lys Arg Leu Asp Gly Ser Val
1 5 10

25

<210> 27

<211> 242

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 27

```

Lys Asp Cys Gln Asp Ile Ala Asn Lys Gly Ala Lys Gln Ser Gly Leu
 1      5      10      15
Tyr Phe Ile Lys Pro Leu Lys Ala Asn Gln Gln Phe Leu Val Tyr Cys
      20      25      30
Glu Ile Asp Gly Ser Gly Asn Gly Trp Thr Val Phe Gln Lys Arg Leu
      35      40      45
Asp Gly Ser Val Asp Phe Lys Lys Asn Trp Ile Gln Tyr Lys Glu Gly
 50      55      60
Phe Gly His Leu Ser Pro Thr Gly Thr Thr Glu Phe Trp Leu Gly Asn
 65      70      75      80
Glu Lys Ile His Leu Ile Ser Thr Gln Ser Ala Ile Pro Tyr Ala Leu
      85      90      95
Arg Val Glu Leu Glu Asp Trp Asn Gly Arg Thr Ser Thr Ala Asp Tyr
      100      105      110
Ala Met Phe Lys Val Gly Pro Glu Ala Asp Lys Tyr Arg Leu Thr Tyr
      115      120      125
Ala Tyr Phe Ala Gly Gly Asp Ala Gly Asp Ala Phe Asp Gly Phe Asp
      130      135      140
Phe Gly Asp Asp Pro Ser Asp Lys Phe Phe Thr Ser His Asn Gly Met
      145      150      155      160
Gln Phe Ser Thr Trp Asp Asn Asp Asn Asp Lys Phe Glu Gly Asn Cys
      165      170      175
Ala Glu Gln Asp Gly Ser Gly Trp Trp Met Asn Lys Cys His Ala Gly
      180      185      190
His Leu Asn Gly Val Tyr Tyr Gln Gly Gly Thr Tyr Ser Lys Ala Ser
      195      200      205
Thr Pro Asn Gly Tyr Asp Asn Gly Ile Ile Trp Ala Thr Trp Lys Thr
      210      215      220
Arg Trp Tyr Ser Met Lys Lys Thr Thr Met Lys Ile Ile Pro Phe Asn
      225      230      235      240
Arg Leu

```

<210> 28
 <211> 215
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 28

ES 2 429 034 T3

```

Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr Ser Gly Met
 1          5          10          15
Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val Tyr Cys Asp

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

```

<210> 29

<211> 215

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

```

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

```

<210> 30
 <211> 215
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 30

```

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

```

<210> 31
 <211> 215
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 31

```

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

```

10

	130					135						140					
	Leu	Asp	Ser	Asp	Asn	Asp	His	Cys	Leu	Cys	Lys	Cys	Ala	Gln	Val	Met	
	145					150					155					160	
	Ser	Gly	Gly	Trp	Trp	Phe	Asp	Ala	Cys	Gly	Leu	Ser	Asn	Leu	Asn	Gly	
					165					170					175		
	Val	Tyr	Tyr	His	Ala	Pro	Asp	Asn	Lys	Tyr	Lys	Met	Asp	Gly	Ile	Arg	
				180					185					190			
	Trp	His	Tyr	Phe	Lys	Gly	Pro	Ser	Tyr	Ser	Leu	Arg	Ala	Ser	Arg	Met	
			195					200					205				
	Met	Ile	Arg	Pro	Leu	Asp	Ile										
	210						215										

<210> 32
 <211> 18
 5 <212> ADN
 <213> Murino

<400> 32

10 atatgccttg gcggatgc 18

<210> 33
 <211> 26
 <212> ADN
 15 <213> Murino

<400> 33

atggacaaaa tctttaagtc catgac 26

20 <210> 34
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Murino

25 <400> 34

ctcccagagc acacagacct gatgtttt 28

30 <210> 35
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Murino

35 <400> 35

gctggcaata tccctggg 18

<210> 36
 40 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Murino

<400> 36

45 agctgtccct ttgctctgtg a 21

REIVINDICACIONES

1. Uso de un antagonista de Angptl3 en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir el daño tisular asociado con una enfermedad hepática inflamatoria, **caracterizado por** el exceso de expresión de Angptl3, en el que el antagonista de Angptl3 se une a Angptl3 o a la integrina $\alpha\beta3$ e inhibe la capacidad de Angptl3 para unirse específicamente a y regular las respuestas celulares mediadas por la integrina $\alpha\beta3$, y en el que el antagonista es:
- 5
- 10 a) un anticuerpo, en el que el anticuerpo es un anticuerpo dirigido contra Angptl3 o un anticuerpo dirigido contra la integrina $\alpha\beta3$;
- b) una inmunoadhesina, en el que la inmunoadhesina comprende la región de unión al ligando de la integrina $\alpha\beta3$ fusionada con una secuencia de inmunoglobulina o la región de unión al receptor de Angptl3 fusionada con una secuencia de inmunoglobulina; o
- 15 c) una combinación de un péptido que comprende la SEQ ID NO: 14, un péptido que comprende la SEQ ID NO: 15 y un péptido que comprende la SEQ ID NO: 17.
2. El uso de la reivindicación 1, en el que la enfermedad hepática inflamatoria comprende cirrosis hepática, fibrosis hepática, hepatitis crónica, hígado graso, lesión por isquemia-reperfusión, septicemia o daño hepático metabólico tóxico.
- 20
3. El uso de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que la enfermedad hepática inflamatoria es daño hepático metabólico tóxico o hígado graso.
- 25
4. El uso de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que la cirrosis hepática es cirrosis hepática alcohólica o cirrosis biliar primaria.
5. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el anticuerpo dirigido contra Angptl3 o el anticuerpo dirigido contra la integrina $\alpha\beta3$, es un anticuerpo monoclonal, fragmento de anticuerpo de unión al antígeno, o anticuerpo monocatenario.
- 30
6. El uso de la reivindicación 5, en el que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado o anticuerpo humano.
- 35
7. El uso de la reivindicación 5, en el que el fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab, Fab', F(ab')₂ o Fv.
8. El uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que prevenir comprende prevenir el avance de la enfermedad hepática.
- 40
9. El uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el Angptl3 comprende una o más regiones de los aminoácidos 281 a 293, 415 a 430 o 442 a 460 de la SEQ ID NO: 2.
- 45
10. El uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el Angptl3 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
11. El uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el Angptl3 es codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1.
- 50
12. Un antagonista de Angptl3 para usar en el tratamiento o prevención de daño tisular asociado con una enfermedad hepática inflamatoria, **caracterizado por** el exceso de expresión de Angptl3, en el que el antagonista de Angptl3 se une a Angptl3 o a la integrina $\alpha\beta3$ e inhibe la capacidad de Angptl3 para unirse específicamente a y regular las respuestas celulares mediadas por la integrina $\alpha\beta3$, y en el que el antagonista es:
- 55
- a) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo, en el que el anticuerpo es un anticuerpo dirigido contra Angptl3 o un anticuerpo dirigido contra la integrina $\alpha\beta3$;
- b) una inmunoadhesina, en el que la inmunoadhesina comprende la región de unión al ligando de la integrina $\alpha\beta3$

fusionada con una secuencia de inmunoglobulina o la región de unión al receptor de Angptl3 fusionada con una secuencia de inmunoglobulina; o

c) una combinación de un péptido que comprende la SEQ ID NO: 14, un péptido que comprende la SEQ ID NO: 15 y un péptido que comprende la SEQ ID NO: 17.

13. El antagonista para usar de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la enfermedad hepática inflamatoria comprende cirrosis hepática, fibrosis hepática, hepatitis crónica, hígado graso, lesión por isquemia-reperfusión, septicemia o daño hepático metabólico tóxico.

10

14. El antagonista para usar de acuerdo con la reivindicación 12 o reivindicación 13, en el que la enfermedad hepática inflamatoria es daño hepático metabólico tóxico o hígado graso.

15. El antagonista para usar de acuerdo con la reivindicación 12 o reivindicación 13, en el que la cirrosis hepática es cirrosis hepática alcohólica o cirrosis biliar primaria.

16. El antagonista para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en el que el anticuerpo dirigido contra Angptl3 o el anticuerpo dirigido contra la integrina $\alpha\beta 3$, es un anticuerpo monoclonal, fragmento de anticuerpo de unión al antígeno, o anticuerpo monocatenario.

20

17. El antagonista para usar de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado o anticuerpo humano.

18. El antagonista para usar de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab, Fab', F(ab')₂ o Fv.

25

19. El antagonista para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18, en el que prevenir comprende prevenir el avance de la enfermedad hepática.

20. El antagonista para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 19, en el que el Angptl3 comprende una o más regiones de los aminoácidos 281 a 293, 415 a 430 o 442 a 460 de la SEQ ID NO: 2.

21. El antagonista para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 20, en el que el Angptl3 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

35

22. El antagonista para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 21, en el que el Angptl3 es codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1.

FIGURA 1

```

GCGGACGCGT GGGTGAAATT GAAAATCAAG ATAAAAATGT TCACAATTAA 50
GCTCCTTCCT TTTATTGTTC CTCTAGTTAT TTCCTCCAGA ATTGATCAAG 100
ACAAATCATC ATTTGATTCT CTATCTCCAG AGCCAAAATC AAGATTTGCT 150
ATGTTAGACG ATGTAAAAAT TTTAGCCAAT GGCCTCCTTC AGTTGGGACA 200
TGGTCTTAAA GACTTTGTCC ATAAGACGAA GGGCCAAATT AATGACATAT 250
TTCAAAAACCT CAACATATTT GATCAGTCTT TTTATGATCT ATCGCTGCAA 300
ACCAGTGAAA TCAAAGAAGA AGAAAAGGAA CTGAGAAGAA CTACATATAA 350
ACTACAAGTC AAAAAATGAAG AGGTAAAGAA TATGTCACTT GAACTCAACT 400
CAAAACCTGA AAGCCTCCTA GAAGAAAAAA TTCTACTTCA ACAAAAAGTG 450
AAATATTTAG AAGAGCAACT AACTAACTTA ATTCAAATC AACCTGAAAC 500
TCCAGAACAC CCAGAAGTAA CTTCACTTAA AACTTTTGTA GAAAAACAAG 550
ATAATAGCAT CAAAGACCTT CTCCAGACCG TGGAAGACCA ATATAAACAA 600
TTAAACCAAC AGCATAGTCA AATAAAAGAA ATAGAAAATC AGCTCAGAAG 650
GACTAGTATT CAAGAACCCA CAGAAATTTT TCTATCTTCC AAGCCAAGAG 700
CACCAAGAAC TACTCCCTTT CTTCACTTGA ATGAAATAAG AAATGTAAAA 750
CATGATGGCA TTCCTGCTGA ATGTACCACC ATTTATAACA GAGGTGAACA 800
TACAAGTGGC ATGTATGCCA TCAGACCCAG CAACTCTCAA GTTTTTCATG 850
TCTACTGTGA TGTTATATCA GGTAGTCCAT GGACATTAAT TCAACATCGA 900
ATAGATGGAT CACAAAACCT CAATGAAACG TGGGAGAACT ACAAATATGG 950
TTTTTGGGAGG CTTGATGGAG AATTTTGGTT GGGCCTAGAG AAGATATACT 1000
CCATAGTGAA GCAATCTAAT TATGTTTTAC GAATTGAGTT GGAAGACTGG 1050
AAAGACAACA AACATTATAT TGAATATTCT TTTTACTTGG GAAATCACGA 1100
AACCAACTAT ACGCTACATC TAGTTGCGAT TACTGGCAAT GTCCCCAATG 1150
CAATCCCGGA AAACAAAGAT TTGGTGTTTT CTACTTGGGA TCACAAAGCA 1200
AAAGGACACT TCAACTGTCC AGAGGGTTAT TCAGGAGGCT GGTGGTGGCA 1250
TGATGAGTGT GGAGAAAACA ACCTAAATGG TAAATATAAC AAACCAAGAG 1300
CAAAATCTAA GCCAGAGAGG AGAAGAGGAT TATCTTGGA GTCTCAAAAT 1350
GGAAGTTTAT ACTCTATAAA ATCAACCAAA ATGTTGATCC ATCCAACAGA 1400
TTCAGAAAGC TTTGAATGAA CTGAGGCAAT TTAAAGGCAT ATTTAACCAT 1450
TAACTCATT CAAAGTTAATG TGGTCTAATA ATCTGGTATA AATCCTTAAG 1500
AGAAAGCTTG AGAAATAGAT TTTTTTTATC TTAAAGTCAC TGTCTATTTA 1550
AGATTAAACA TACAATCACA TAACCTTAAA GAATACCGTT TACATTTCTC 1600
AATCAAATTT CTTATAATAC TATTTGTTTT AAATTTTGTG ATGTGGGAAT 1650
CAATTTTAGA TGGTCACAAT CTAGATTATA ATCAATAGGT GAACTTATTA 1700
ATAACTTTT CTAAATAAAA AATTTAGAGA CTTTTATTTT AAAAGGCATC 1750
ATATGAGCTA ATATCACAAC TTTCCAGTT TAAAAACTA GTACTCTTGT 1800
TAAAACCTTA AACTTGACTA AATACAGAGG ACTGGTAATT GTACAGTTCT 1850
TAAATGTTGT AGTATTAAT TCAAACATA AAATCGTCAG CACAGAGTAT 1900
GTGTAAAAAT CTGTAATACA AATTTTTAAA CTGATGCTTC ATTTTGCTAC 1950
AAAATAATTT GGAGTAAATG TTTGATATGA TTTATTTATG AAACCTAATG 2000
AAGCAGAATT AAATACTGTA TTAAATAAG TTCGCTGTCT TT 2042

```

FIGURA 2A

MET	PHE	THR	ILE	LYS	LEU	LEU	LEU	PHE	ILE	VAL	PRO	LEU	VAL	ILE
1				5					10					15
SER	SER	ARG	ILE	ASP	GLN	ASP	ASN	SER	SER	PHE	ASP	SER	LEU	SER
				20					25					30
PRO	GLU	PRO	LYS	SER	ARG	PHE	ALA	MET	LEU	ASP	ASP	VAL	LYS	ILE
				35					40					45
LEU	ALA	ASN	GLY	LEU	LEU	GLN	LEU	GLY	HIS	GLY	LEU	LYS	ASP	PHE
				50					55					60
VAL	HIS	LYS	THR	LYS	GLY	GLN	ILE	ASN	ASP	ILE	PHE	GLN	LYS	LEU
				65					70					75
ASN	ILE	PHE	ASP	GLN	SER	PHE	TYR	ASP	LEU	SER	LEU	GLN	THR	SER
				80					85					90
GLU	ILE	LYS	GLU	GLU	GLU	LYS	GLU	LEU	ARG	ARG	THR	THR	TYR	LYS
				95					100					105
LEU	GLN	VAL	LYS	ASN	GLU	GLU	VAL	LYS	ASN	MET	SER	LEU	GLU	LEU
				110					115					120
ASN	SER	LYS	LEU	GLU	SER	LEU	LEU	GLU	GLU	LYS	ILE	LEU	LEU	GLN
				125					130					135
GLN	LYS	VAL	LYS	TYR	LEU	GLU	GLU	GLN	LEU	THR	ASN	LEU	ILE	GLN
				140					145					150
ASN	GLN	PRO	GLU	THR	PRO	GLU	HIS	PRO	GLU	VAL	THR	SER	LEU	LYS
				155					160					165
THR	PHE	VAL	GLU	LYS	GLN	ASP	ASN	SER	ILE	LYS	ASP	LEU	LEU	GLN
				170					175					180
THR	VAL	GLU	ASP	GLN	TYR	LYS	GLN	LEU	ASN	GLN	GLN	HIS	SER	GLN
				185					190					195
ILE	LYS	GLU	ILE	GLU	ASN	GLN	LEU	ARG	ARG	THR	SER	ILE	GLN	GLU
				200					205					210
PRO	THR	GLU	ILE	SER	LEU	SER	SER	LYS	PRO	ARG	ALA	PRO	ARG	THR
				215					220					225
THR	PRO	PHE	LEU	GLN	LEU	ASN	GLU	ILE	ARG	ASN	VAL	LYS	HIS	ASP
				230					235					240
GLY	ILE	PRO	ALA	GLU	CYS	THR	THR	ILE	TYR	ASN	ARG	GLY	GLU	HIS
				245					250					255
THR	SER	GLY	MET	TYR	ALA	ILE	ARG	PRO	SER	ASN	SER	GLN	VAL	PHE
				260					265					270
HIS	VAL	TYR	CYS	ASP	VAL	ILE	SER	GLY	SER	PRO	TRP	THR	LEU	ILE
				275					280					285
GLN	HIS	ARG	ILE	ASP	GLY	SER	GLN	ASN	PHE	ASN	GLU	THR	TRP	GLU
				290					295					300
ASN	TYR	LYS	TYR	GLY	PHE	GLY	ARG	LEU	ASP	GLY	GLU	PHE	TRP	LEU
				305					310					315
GLY	LEU	GLU	LYS	ILE	TYR	SER	ILE	VAL	LYS	GLN	SER	ASN	TYR	VAL
				320					325					330
LEU	ARG	ILE	GLU	LEU	GLU	ASP	TRP	LYS	ASP	ASN	LYS	HIS	TYR	ILE
				335					340					345

FIGURA 2B

GLU	TYR	SER	PHE	TYR	LEU	GLY	ASN	HIS	GLU	THR	ASN	TYR	THR	LEU
				350					355					360
HIS	LEU	VAL	ALA	ILE	THR	GLY	ASN	VAL	PRO	ASN	ALA	ILE	PRO	GLU
				365					370					375
ASN	LYS	ASP	LEU	VAL	PHE	SER	THR	TRP	ASP	HIS	LYS	ALA	LYS	GLY
				380					385					390
HIS	PHE	ASN	CYS	PRO	GLU	GLY	TYR	SER	GLY	GLY	TRP	TRP	TRP	HIS
				395					400					405
ASP	GLU	CYS	GLY	GLU	ASN	ASN	LEU	ASN	GLY	LYS	TYR	ASN	LYS	PRO
				410					415					420
ARG	ALA	LYS	SER	LYS	PRO	GLU	ARG	ARG	ARG	GLY	LEU	SER	TRP	LYS
				425					430					435
SER	GLN	ASN	GLY	ARG	LEU	TYR	SER	ILE	LYS	SER	THR	LYS	MET	LEU
				440					445					450
ILE	HIS	PRO	THR	ASP	SER	GLU	SER	PHE	GLU					
				455					460					

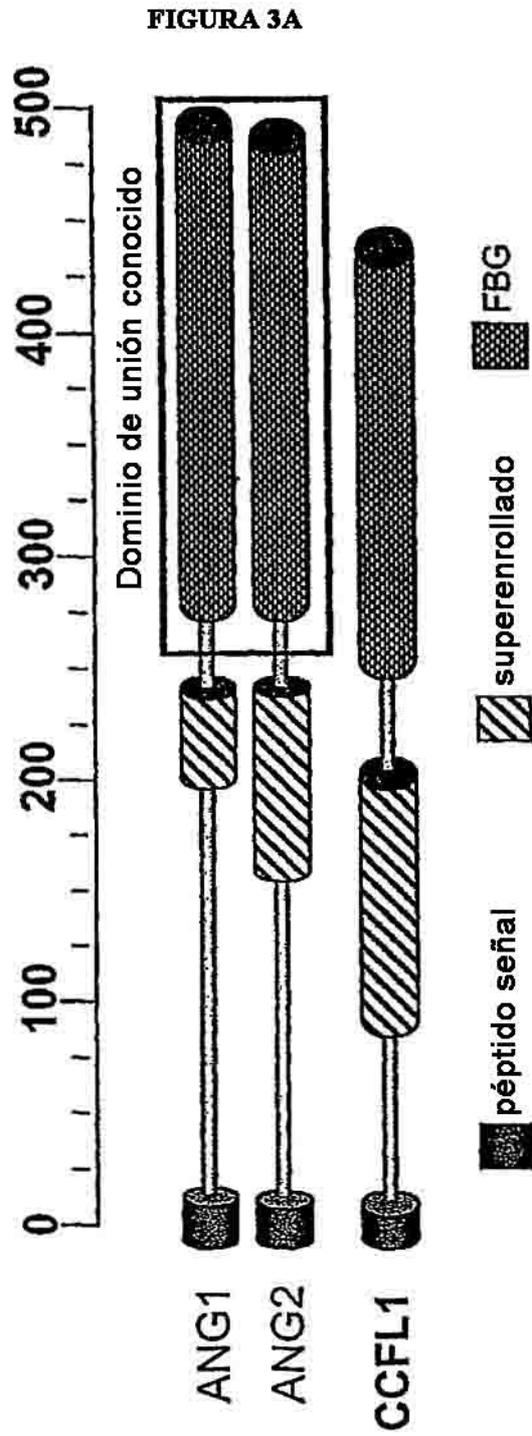
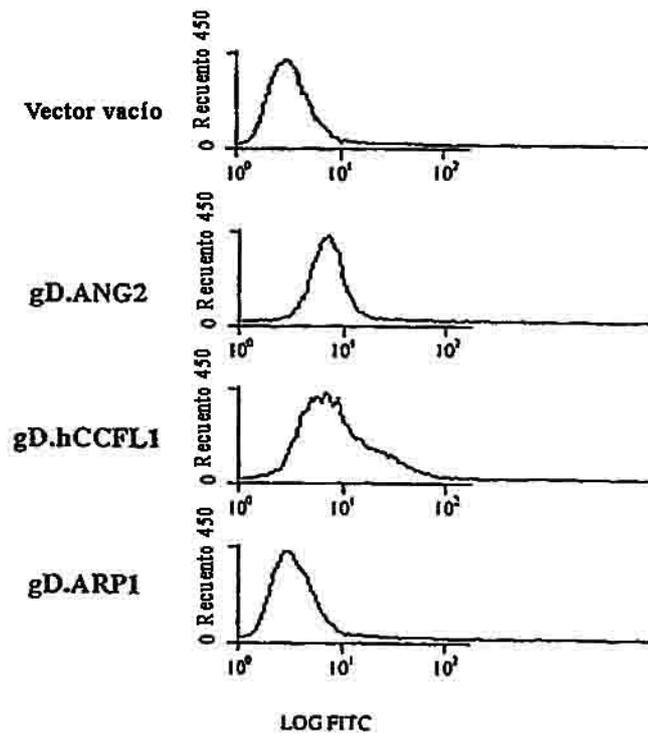


FIGURA 3B



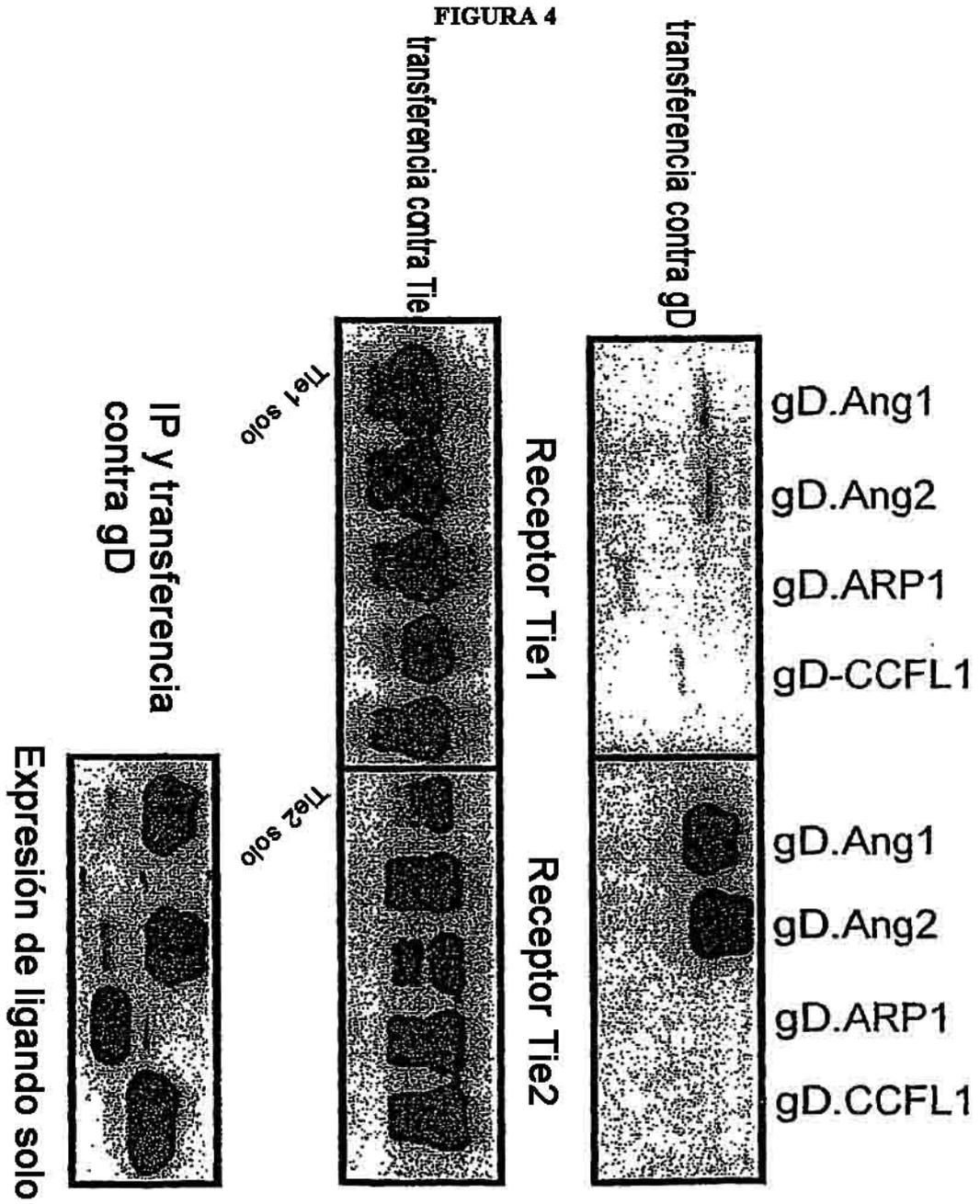


FIGURA 6A-C

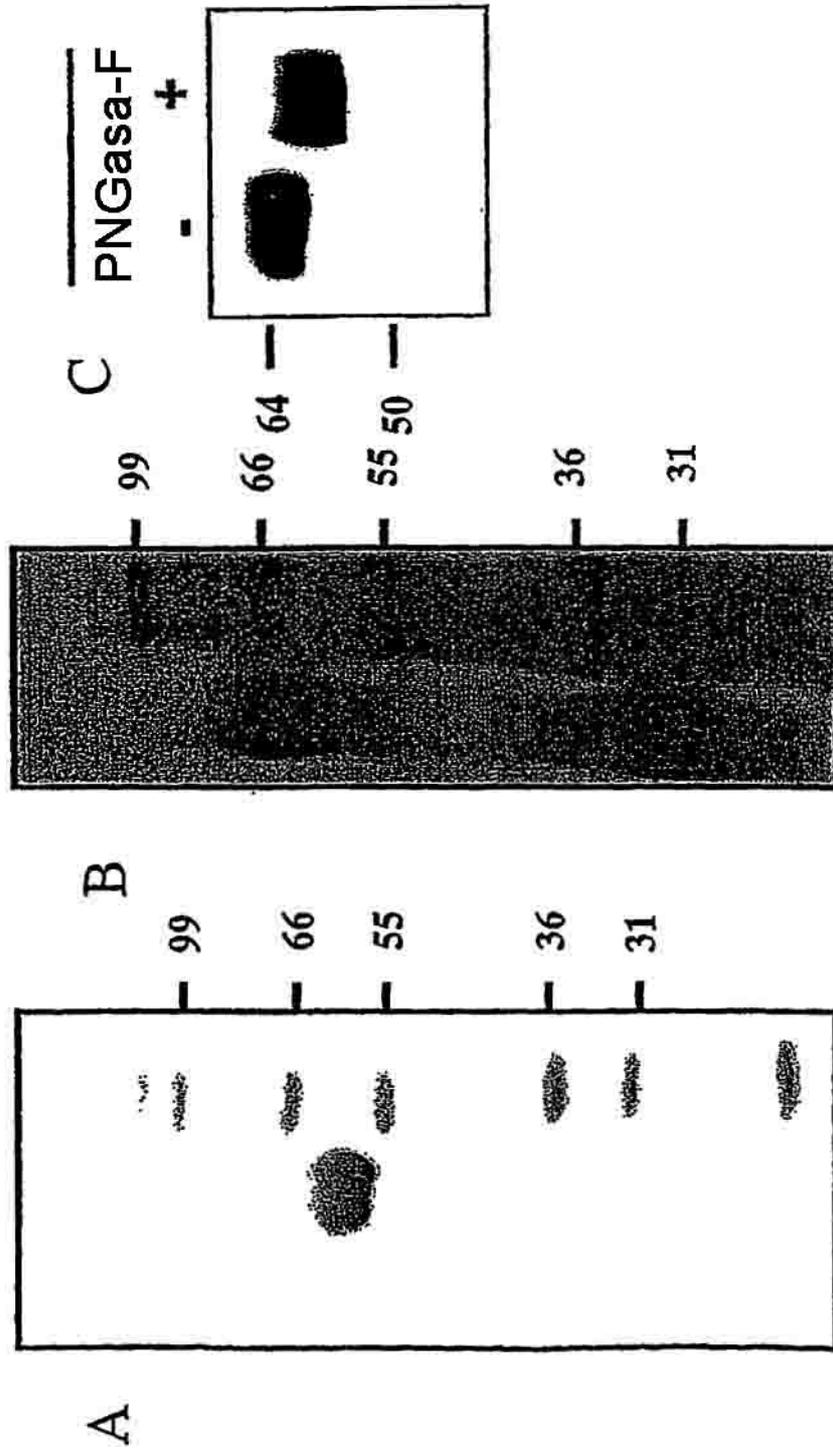


FIGURA 7A

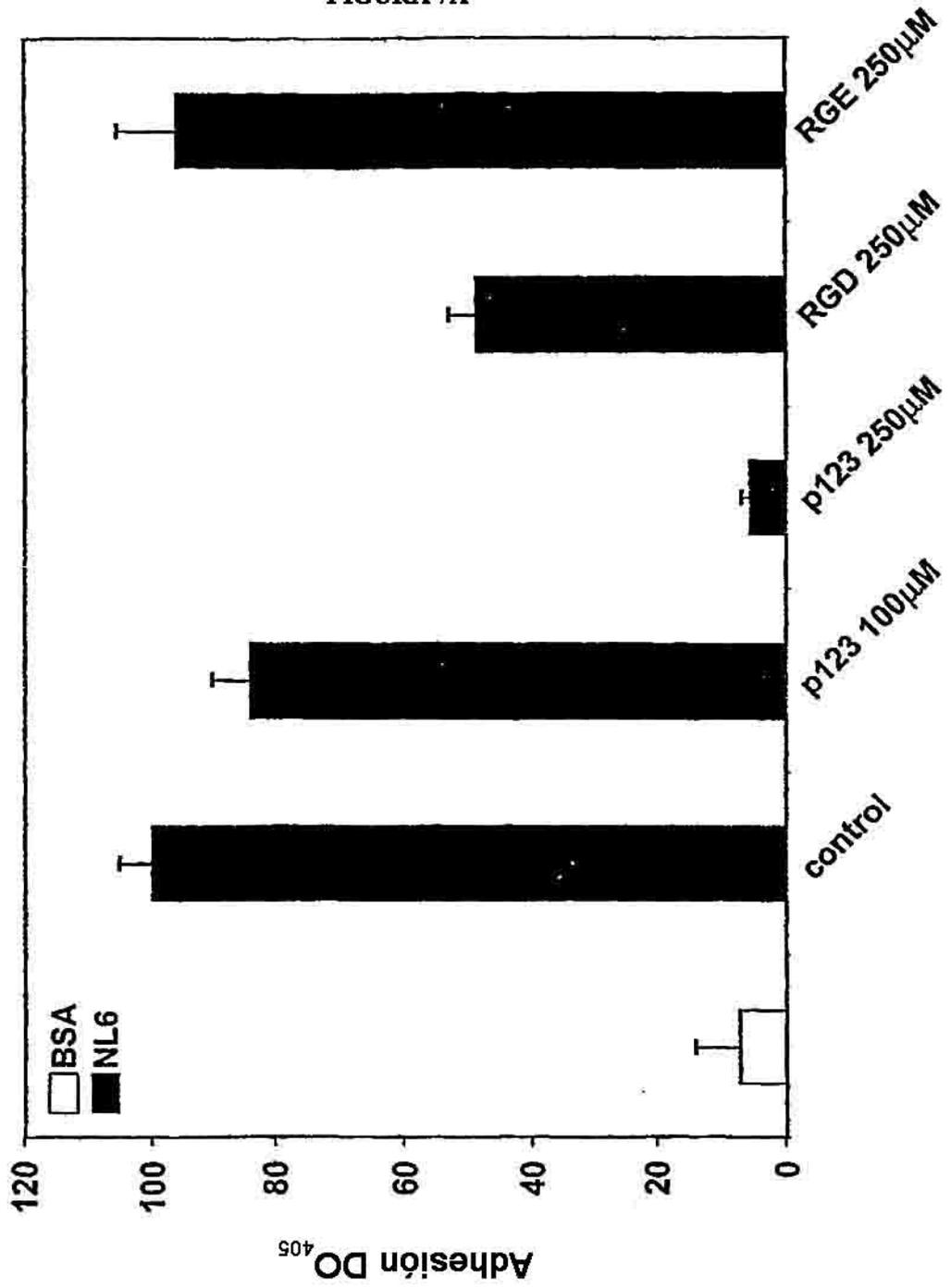


FIGURA 7B

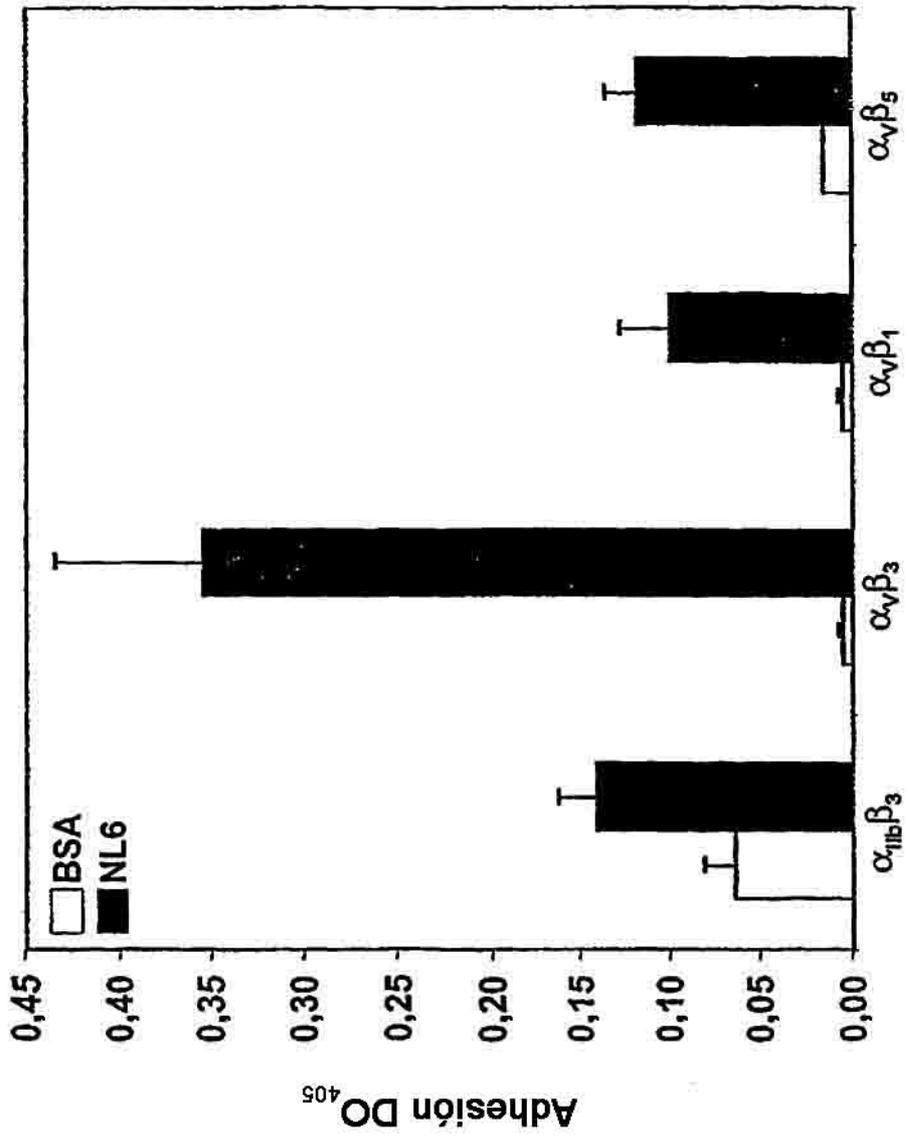


FIGURA 7C

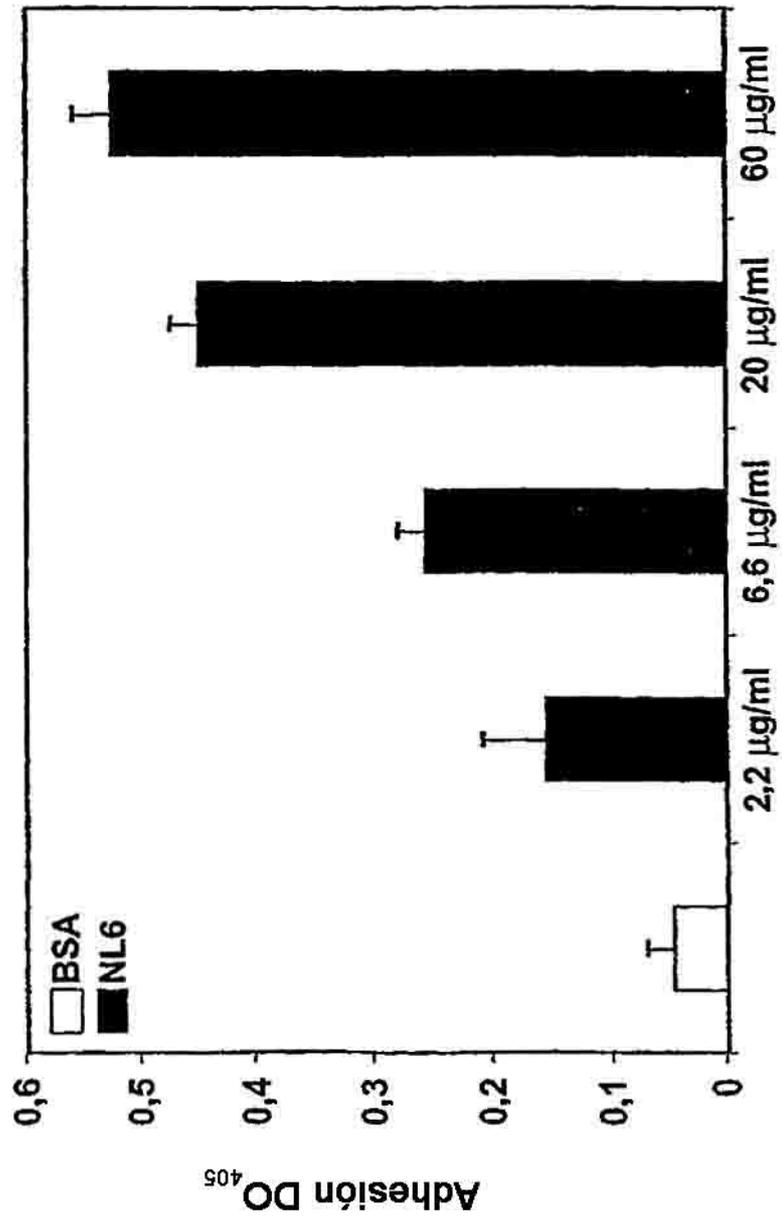


FIGURA 7D

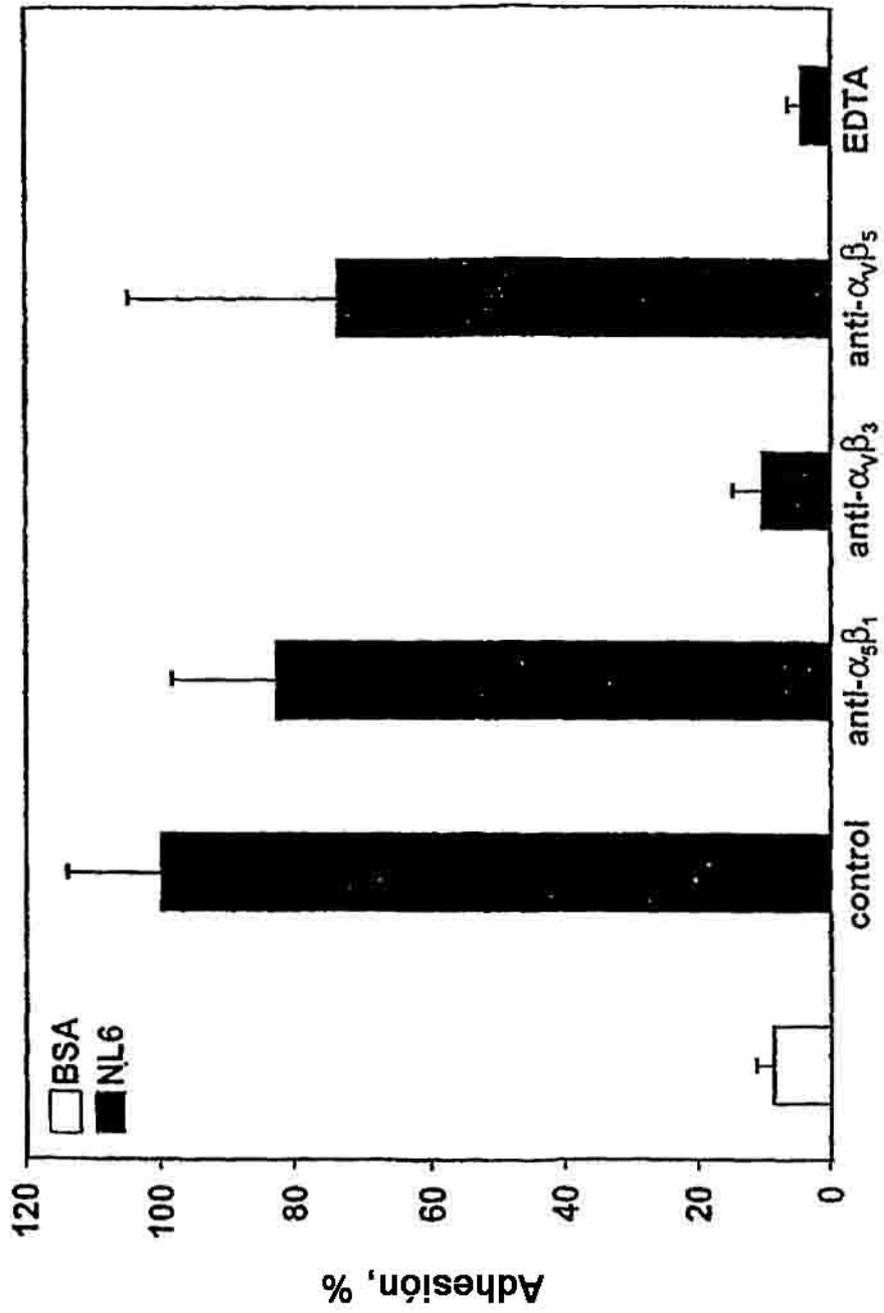


FIGURA 7E

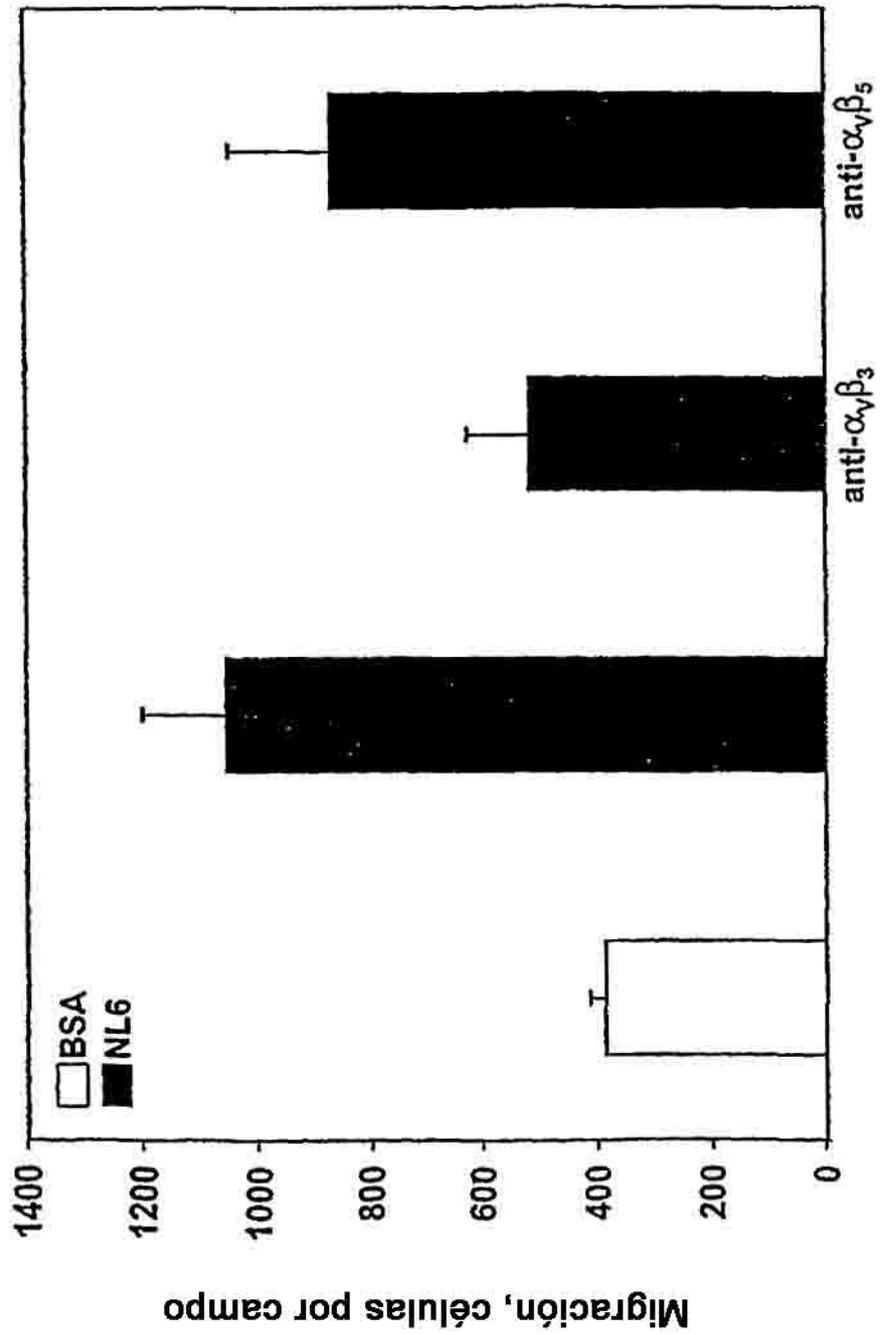


FIGURA 8A

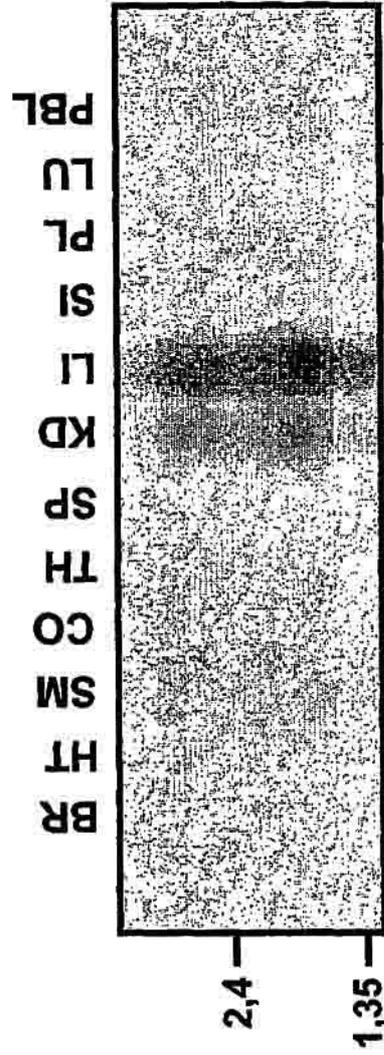
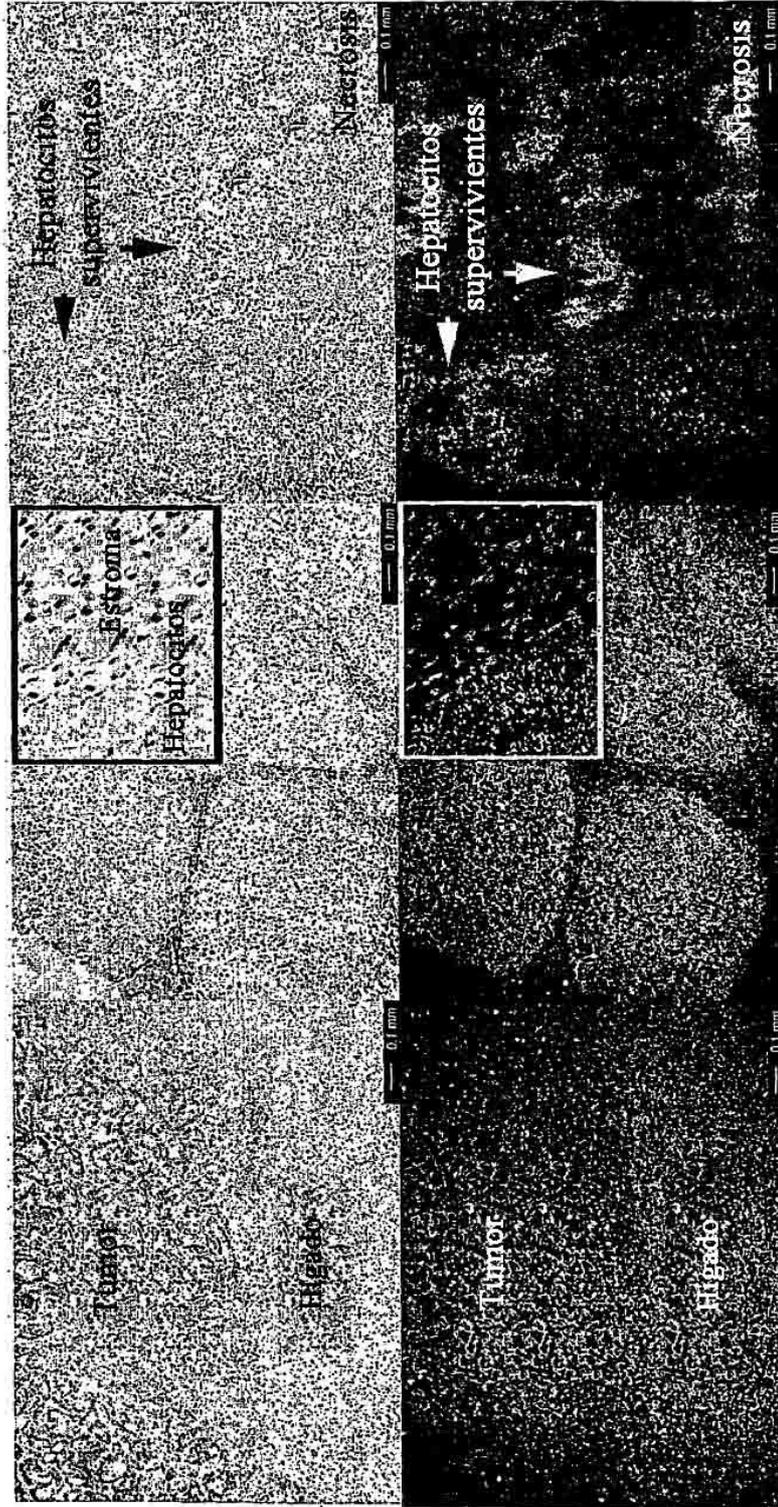


FIGURA 8B



Adenocarcinoma
metastático

Cirrosis

Hepatotoxicidad por
acetaminofeno

FIGURA 8C

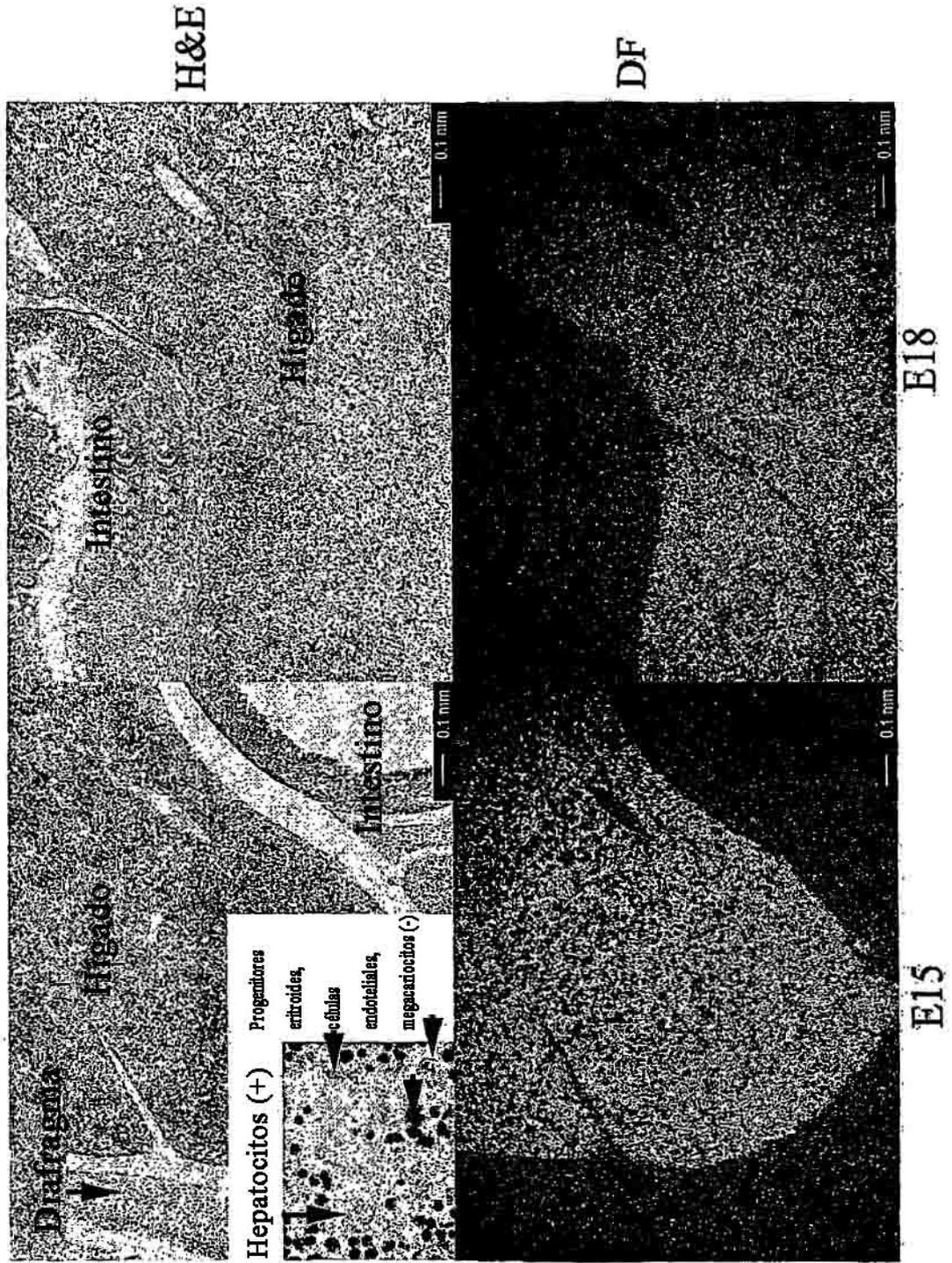


FIGURA 9A-D

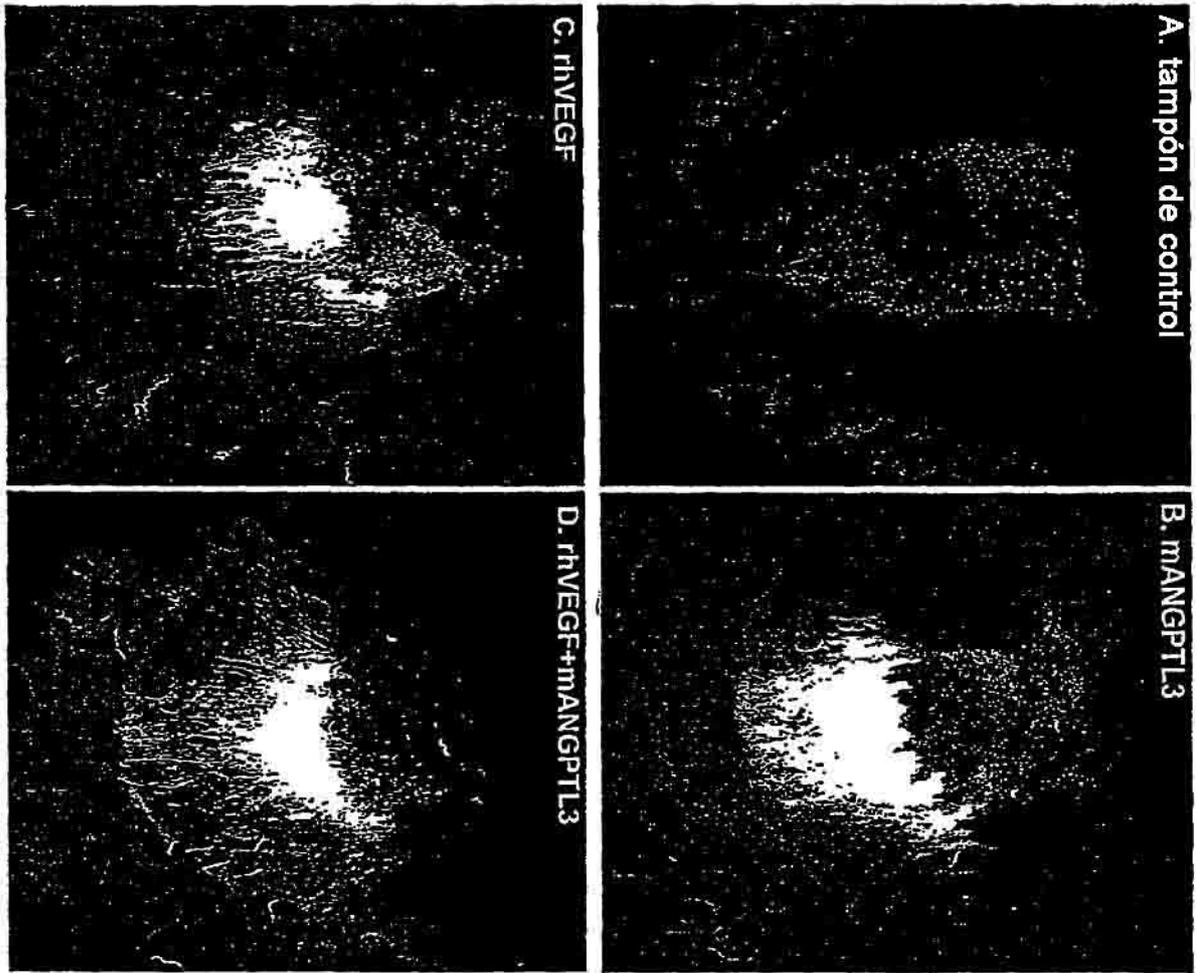


FIGURA 9E

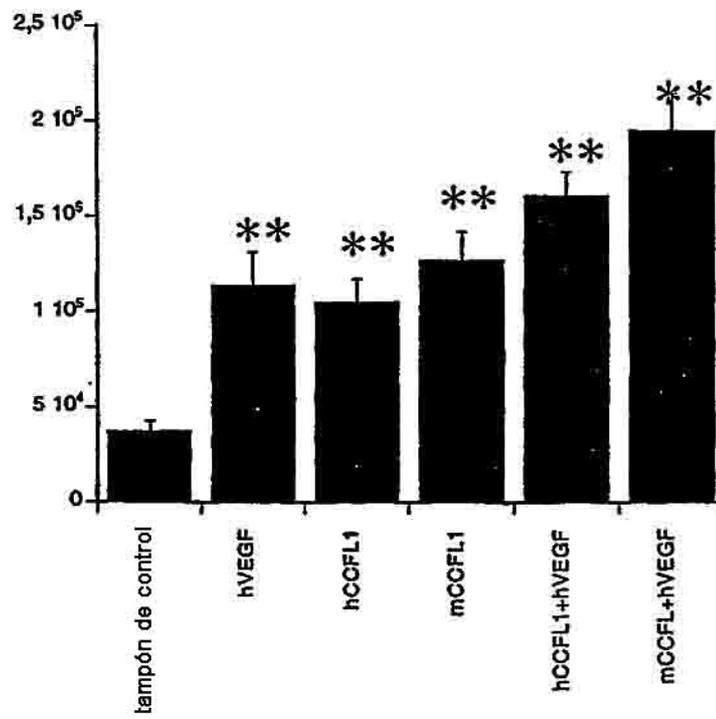


FIGURA 10A



- ← PBS
- ← LacZ
- ← Ad-mAngptl3
- ← Ad-hAngptl3
- ← AdhAngl
- ← 6 Marcador

FIGURA 10B

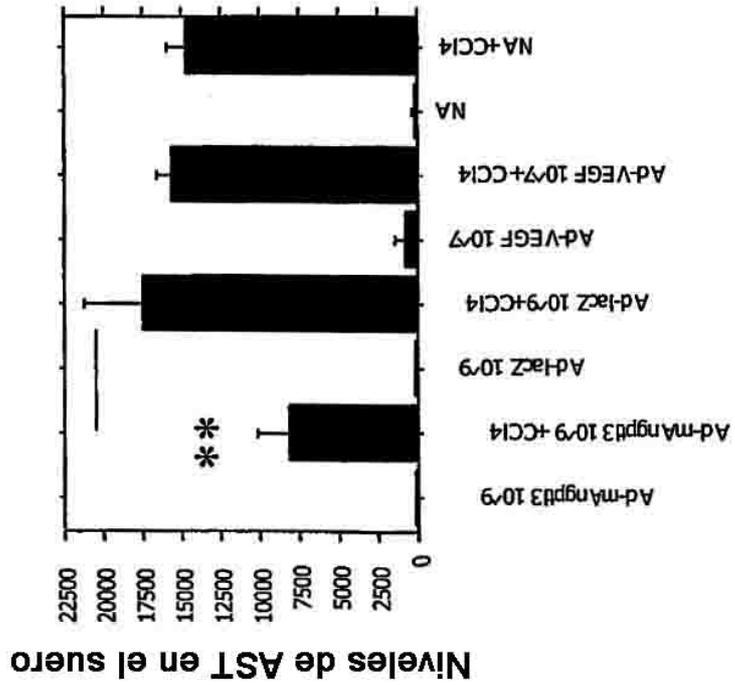


Tabla de medias para AST
Efecto: columna 1
Exclusión de fila: química sangre/estadística/datos

Recuento	Media	Des. típica	Error típico
6	93,167	28,833	11,771
6	8146,167	5053,651	2063,144
5	112,400	56,853	25,426
6	17508,167	9315,235	3802,929
6	777,333	1503,013	613,603
6	15646,333	2150,884	878,095
6	192,833	134,847	55,051
6	14713,000	3141,098	1282,348

Ad-gDmCCFL1 10⁹
Ad-gDmCCFL1 10⁹ +CC14
Ad-lacZ 10⁹
Ad-lacZ 10⁹+CC14
Ad-VEGF 10⁷
Ad-VEGF 10⁷+ CC14
NA
NA+CC14

P<0,0001

FIGURA 11A

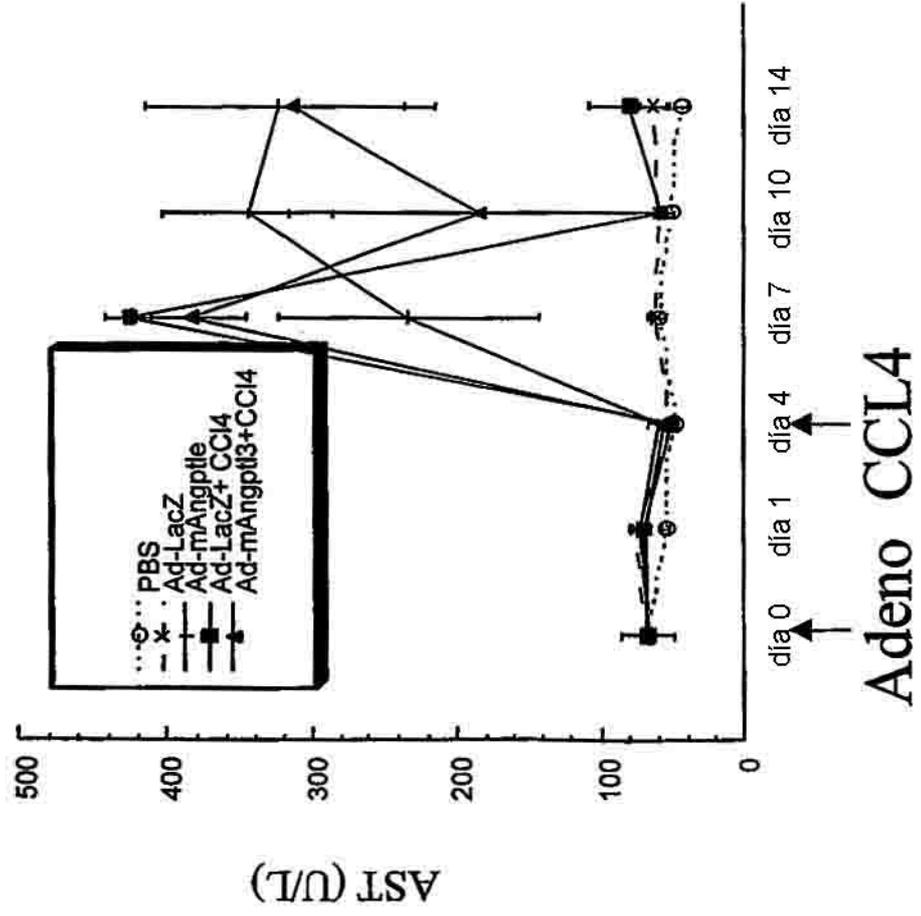


FIGURA 11B

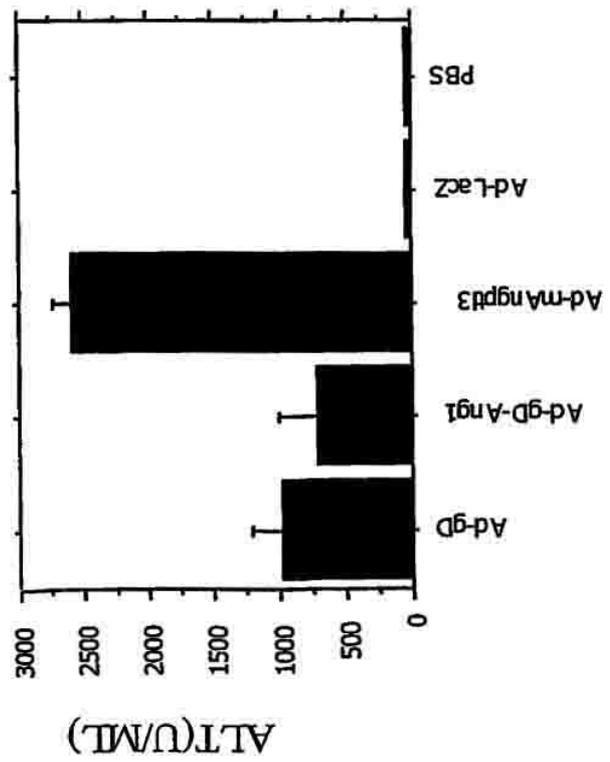
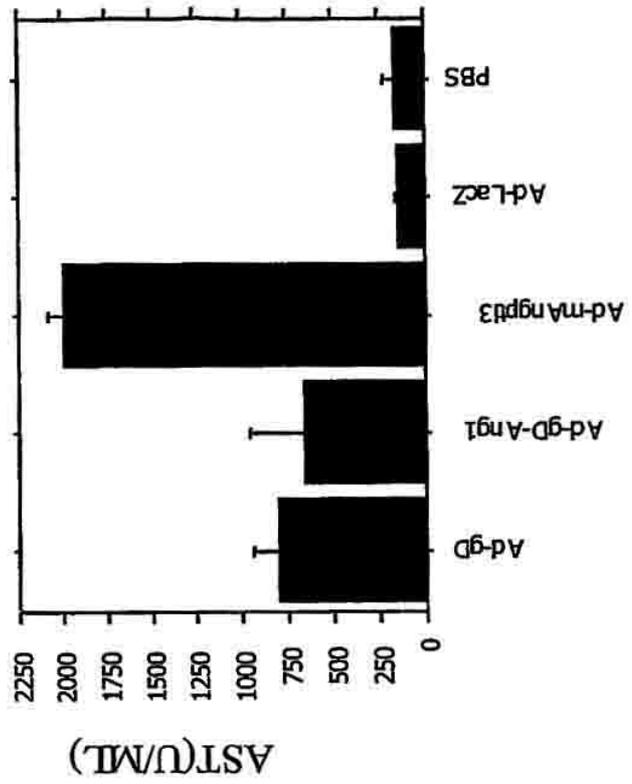
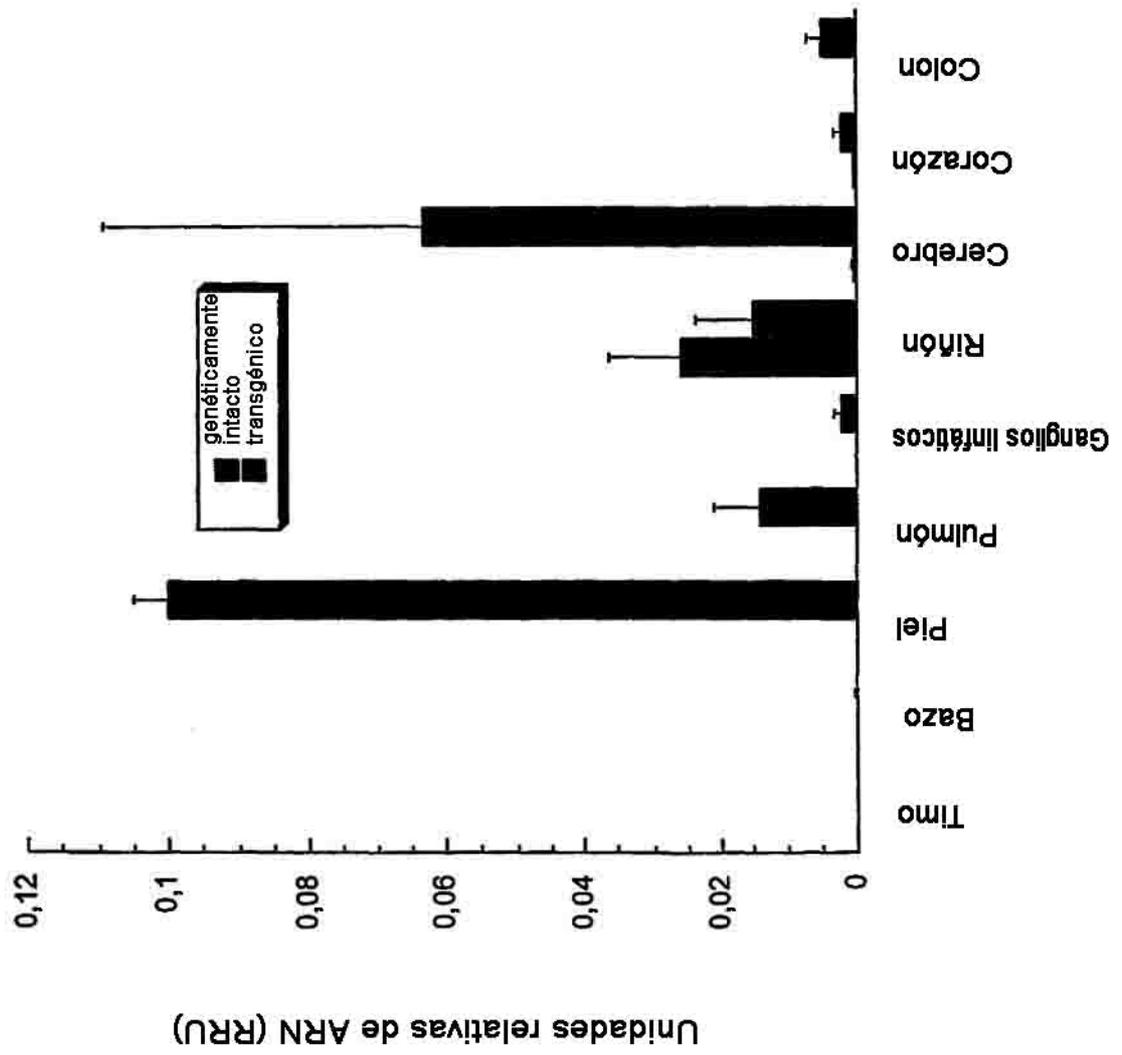


FIGURA 12A



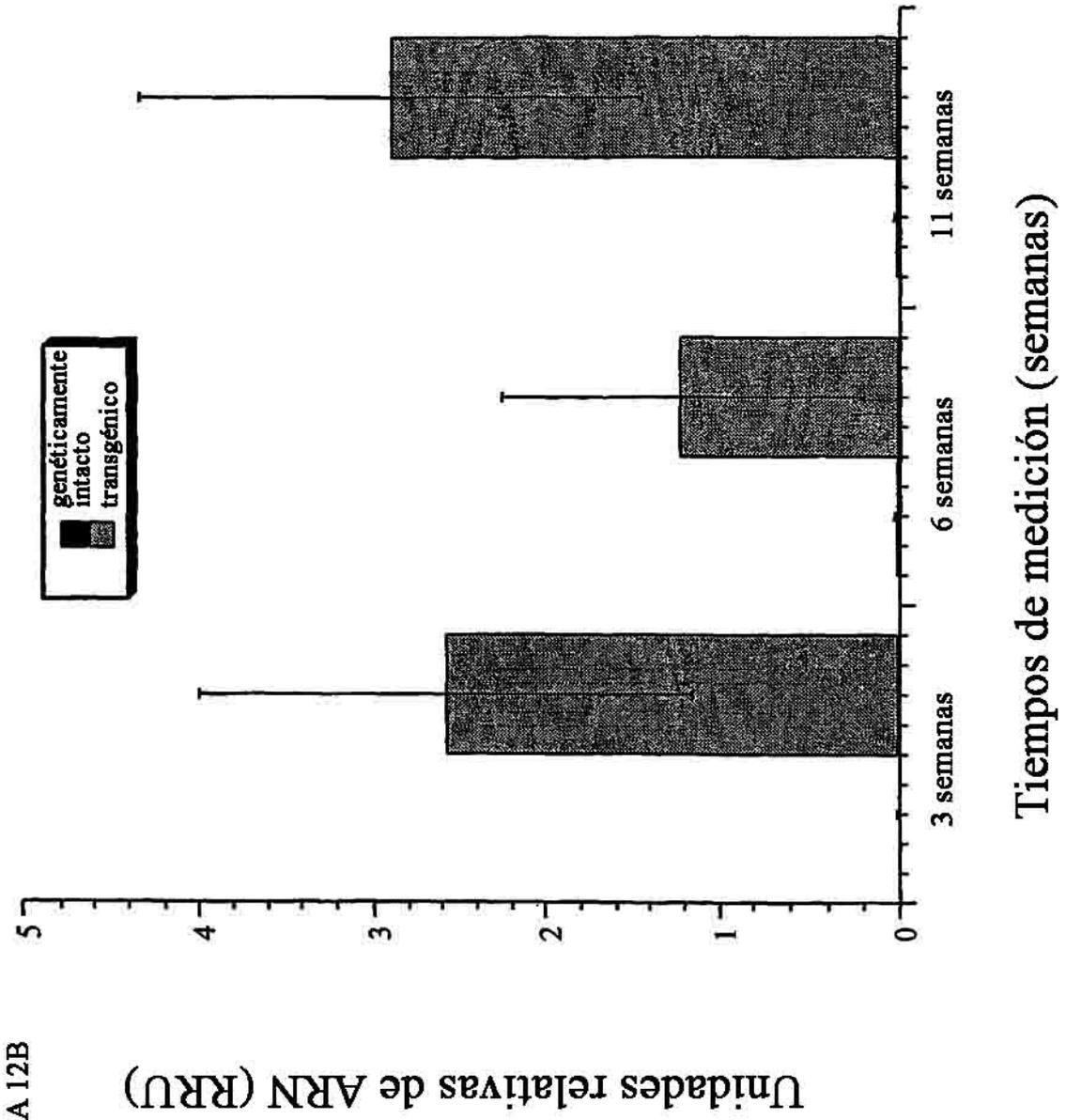


FIGURA 12B

FIGURA 12C

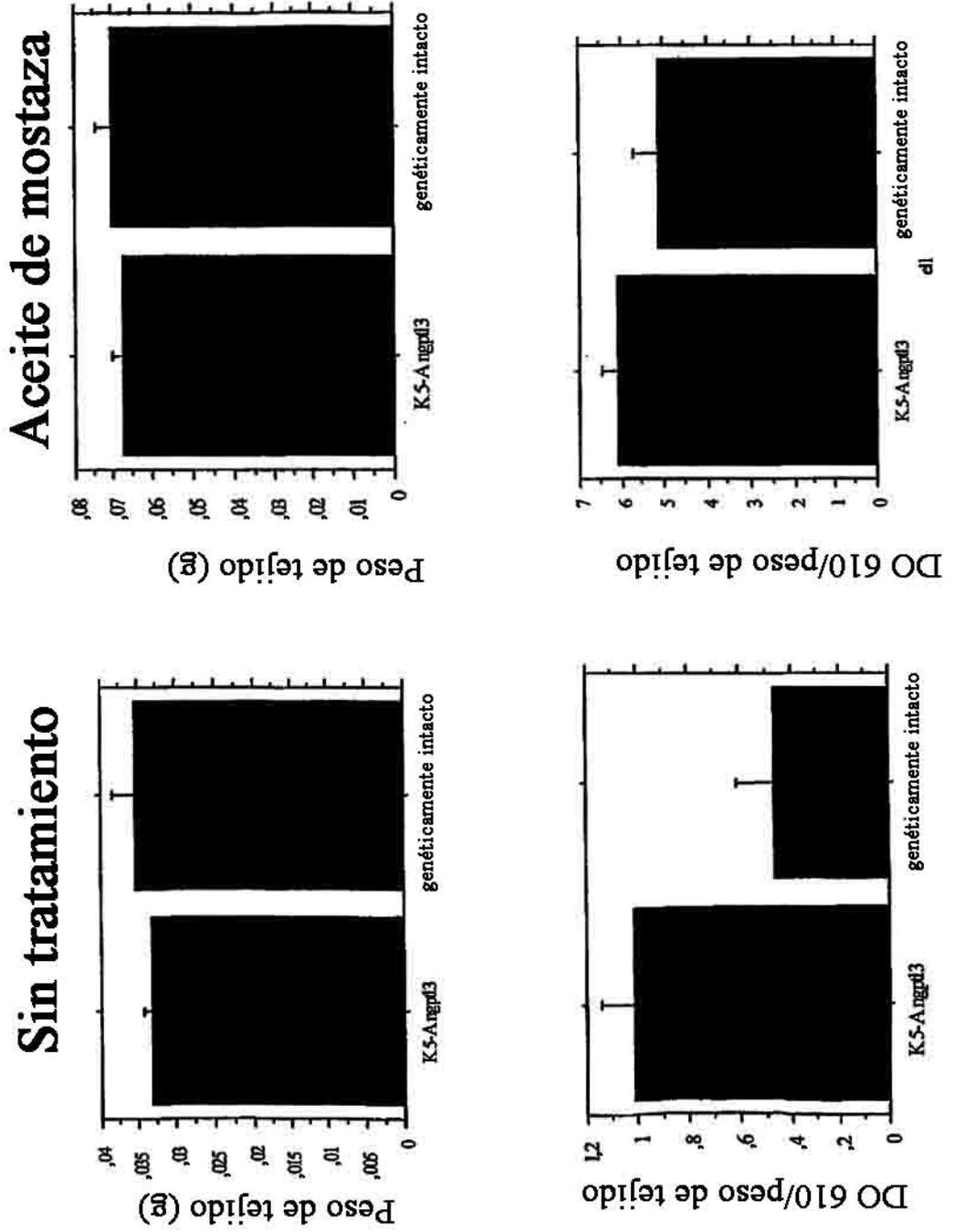


FIGURA 12D

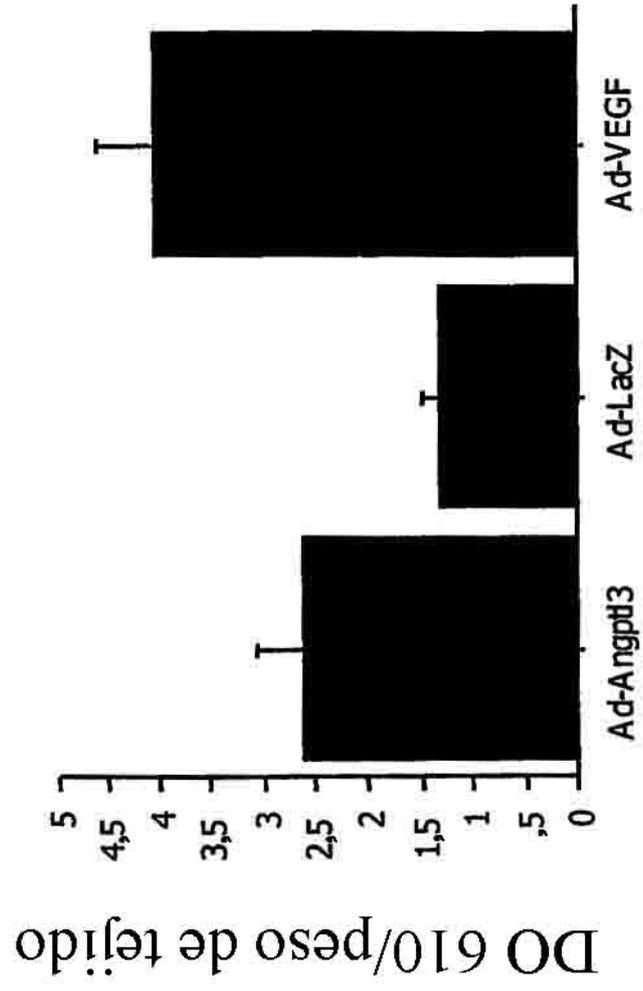


FIGURA 13

