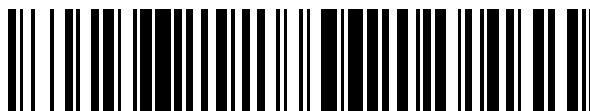


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 440 932**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.08.2001 E 10012457 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2013 EP 2359853**

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

30 Prioridad:

**08.08.2000 US 223739**

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

**31.01.2014**

73 Titular/es:

**TECHNION RESEARCH AND DEVELOPMENT  
FOUNDATION, LTD. (100.0%)**

**Gutwirth Science Park Technion City  
32000 Haifa, IL**

72 Inventor/es:

**NEUFELD, GERA;  
AKIRI, GAL;  
VADASZ, ZAHAVA y  
GENGROVITCH, STELA**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

**ES 2 440 932 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Composiciones farmacéuticas y procedimientos útiles para modular la angiogénesis.

5 CAMPO Y ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas y procedimientos útiles para modular la angiogénesis.

10 [0002] En un adulto, la formación de nuevos vasos sanguíneos en tejidos normales o enfermos está regulada por dos procesos, a saber, la vasculogénesis (la transformación de arteriolas preexistentes en pequeñas arterias musculares) y la angiogénesis, el brote de vasos sanguíneos existentes (que se produce en el embrión y en el adulto).

15 [0003] El proceso de la angiogénesis está regulado por estímulos biomecánicos y bioquímicos. Los factores angiogénicos, tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF) son liberados por células vasculares, macrófagos y vasos sanguíneos que rodean las células. Estos factores angiogénicos activan proteasas específicas que están implicadas en la degradación de la membrana basal. Como resultado de esta degradación, las células vasculares migran y proliferan de modo que conducen a la  
20 formación de un nuevo vaso sanguíneo. Las células periendotheliales, tales como los pericitos en los capilares, las células de músculo liso en los vasos más grandes y los miocitos cardíacos en el corazón son reclutadas para proporcionar funciones de mantenimiento y moduladoras al vaso en formación.

[0004] El establecimiento y el remodelado de los vasos sanguíneos están controlados por las señales paracrinas, muchas de las cuales están mediadas por los ligandos proteicos que modulan la actividad de los receptores transmembrana de tirosina quinasa. Entre estas moléculas se encuentran el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y sus familias de receptores (VEGFR-1, VEGFR-2, neuropilina-1 y neuropilina-2) , angiopoyetinas 1-4 (Ang-1, Ang-2 etc.) y sus respectivos receptores (Tie-1 y Tie-2) , el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) .  
25  
30

[0005] El crecimiento de tumores sólidos está limitado por la disponibilidad de nutrientes y de oxígeno. Cuando las células dentro de los tumores sólidos comienzan a producir factores angiogénicos o cuando los niveles de inhibidores de la angiogénesis disminuyen, se altera el equilibrio entre las influencias antiangiogénicas y angiogénicas, lo que inicia el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir del lecho vascular existente en el tumor. Este suceso en la progresión tumoral se conoce como desplazamiento angiogénico (1,2). Se había demostrado que los inhibidores de la angiogénesis tumoral son capaces de inhibir completamente el crecimiento tumoral en ratones (3,4) y también inhiben la metástasis tumoral, un proceso que depende del estrecho contacto entre la vasculatura y las células tumorales (5). También se ha demostrado que la angiogénesis desempeña un papel importante en la progresión del cáncer de mama (6-9).  
35  
40

[0006] Kirschmann et al., 1999, Breasts Cancer Research and Treatment, vol. 127-136, describen que algunos genes se expresan diferencialmente en el cáncer de mama metastásico.

[0007] Dicho hallazgo ha urgido el uso de factores antiangiogénicos conocidos en la terapia del cáncer de mama (10-12) y una búsqueda de nuevos inhibidores de la angiogénesis.  
45

[0008] Durante la última década se han aislado varios inhibidores nuevos de la angiogénesis, incluidos los inhibidores de la señalización del VEGF (13) e inhibidores de los procesos que conducen a la maduración y estabilización de nuevos vasos sanguíneos. Los anticuerpos anti-integrina se han usado como inhibidores de la maduración de los vasos sanguíneos (14,15) .  
50

[0009] Aunque actualmente existen comercialmente varios fármacos anti-angiogénicos, los mecanismos anti-angiogénicos de la mayoría de estos fármacos (por ejemplo, angiostatina y endostatina) todavía no están claros (16,17) .  
55

[0010] Dado que la angiogénesis la pueden iniciar numerosos factores angiogénicos (posiblemente compensatorios), esta la razón por la cual los factores antiangiogénicos dirigidos a procesos posteriores en la respuesta angiogénica, tal como la maduración del vaso o una combinación de factores antiangiogénicos, sería lo más eficaz para detener la formación del vaso.  
60

[0011] El factor 4 plaquetario (PF4) es una proteína antiangiogénica que normalmente se secuestra en las plaquetas (18-20). El PF4 inhibe la angiogénesis usando mecanismos poco definidos (21-24). Anteriormente se especuló que el PF4 se une a los proteoglicanos de heparán sulfato de superficie celular y, de este modo, inhibe la actividad de los factores de crecimiento angiogénicos, tales como el factor de crecimiento básico de fibroblastos (24).  
65

**[0012]** Reduciendo la presente invención a la práctica y buscando factores o dianas antiangiogénicos alternativos, los presentes inventores han descubierto una nueva proteína de unión a PF4 que participa en la modulación de la angiogénesis.

5 **[0013]** Como ha demostrado el presente estudio, esta proteína, que en el presente documento se denomina LOR-1, se expresa mucho en células endoteliales cultivadas, además de en otras células de vasos sanguíneos. Además, los niveles de expresión de LOR-1 se pueden correlacionar con las propiedades metastásicas de las líneas celulares derivadas de cáncer de mama, lo que indica que LOR-1 puede desempeñar papeles adicionales en la progresión del tumor además de un papel en la angiogénesis.

10

#### DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

15 **[0014]** Según un aspecto del presente documento, se proporciona un procedimiento de modulación de la angiogénesis en un tejido de mamífero, comprendiendo el procedimiento administrar en el tejido de mamífero una molécula capaz de modificar un nivel y/o actividad de tejido de por lo menos un tipo de lisil-oxidasa para modular de este modo la angiogénesis en el tejido de mamífero.

20 **[0015]** Según otro aspecto del presente documento, se proporciona un procedimiento de modulación de la angiogénesis en un tejido de mamífero, comprendiendo el procedimiento administrar en el tejido de mamífero un constructo de ácido nucleico capaz de expresar un polipéptido que tiene actividad de lisil-oxidasa para modular de este modo la angiogénesis en el tejido de mamífero.

25 **[0016]** Según aún otro aspecto del presente documento, se proporciona una composición farmacéutica útil para modular la angiogénesis en un tejido de mamífero, comprendiendo la composición de materia, como principio activo, una molécula capaz de modificar el nivel y/o la actividad de por lo menos un tipo de lisil-oxidasa del tejido de mamífero y un portador farmacéuticamente aceptable.

30 **[0017]** Según características adicionales que se describen más adelante, la molécula es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo capaz de unirse a, y al menos parcialmente inhibir la actividad de, dicho al menos un polipéptido.

**[0018]** Según otras características adicionales, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo está dirigido contra al menos una parte del polipéptido establecido en las SEC ID N° 2, 3, 6, 8 ó 9.

35 **[0019]** Según otras características adicionales, la molécula descrita es un polinucleótido capaz de regular por disminución la expresión de al menos un tipo de lisil oxidasa.

40 **[0020]** Según otras características adicionales, el polinucleótido es al menos parcialmente complementario al polinucleótido establecido en las SEC ID N° 1, 4, 5 ó 7.

**[0021]** Según otras características adicionales, la molécula es un polinucleótido que tiene actividad de lisil-oxidasa.

45 **[0022]** Según otras características adicionales, el polipéptido es tal como se establece en las SEC ID N° 2, 3, 6, 8 ó 9.

**[0023]** Se proporciona un procedimiento de modulación de angiogénesis en un tejido de mamífero, comprendiendo el procedimiento administrar en el tejido de mamífero un constructo de ácido nucleico capaz de expresar un polipéptido que tiene actividad de lisil-oxidasa para modular de este modo la angiogénesis en el tejido de mamífero.

50 **[0024]** El polipéptido tiene por lo menos un 75% de homología con el polipéptido establecido en las SEC ID N° 2, 3, 6, 8 ó 9.

55 **[0025]** Según otro aspecto del presente documento, se proporciona un procedimiento de identificación de moléculas capaces de modular la angiogénesis, comprendiendo el procedimiento: (a) aislar moléculas que muestran una reactividad específica con por lo menos un tipo de lisil-oxidasa; y (b) analizar la molécula en un tejido de mamífero para determinar la actividad de modulación de la angiogénesis de la misma.

**[0026]** La etapa (a) se realiza mediante ensayos de unión y/o ensayos de actividad de lisil-oxidasa.

60 **[0027]** Según la presente invención se proporciona un procedimiento de determinación del carácter maligno de tejido canceroso, comprendiendo el procedimiento (a) determinar el nivel de expresión y/o actividad de LOR-1 del tejido canceroso; y (b) comparar el nivel de expresión y/o actividad de LOR-1 con el determinado para el tejido de control para determinar de este modo el carácter maligno del tejido canceroso, en el que un incremento en el nivel de expresión y/o actividad de LOR-1 se correlaciona con el carácter maligno.

65

**[0028]** La presente invención aborda con éxito las limitaciones de las configuraciones conocidas actualmente

proporcionando composiciones farmacéuticas y procedimientos que se pueden usar para tratar trastornos caracterizados por una excesiva o insuficiente formación de vasos sanguíneos.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5 **[0029]** En las figuras:

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

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

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

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

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

35 Las figura 6a-d ilustran secciones de hígado de pacientes con enfermedad de Wilson (Figuras 6c-d) y pacientes normales (Figuras 6a-b) usando sondas sentido de LOR-1 (Figuras 6a, 6c) y sondas antisentido (Figuras 6b, 6d).

40 La figura 7 ilustra los resultados de una hibridación in situ de una cantidad entera usando una sonda de ADNc de LOR-1 y un embrión de pollo de 4 días. Se observa una fuerte expresión de ARNm de LOR-1 en vasos sanguíneos amnióticos (flecha).

45 La figura 8 ilustra la alineación de secuencia de varias lisil oxidasas, incluida la LOR-1.

#### DESCRIPCIÓN DE LA REALIZACIÓN PREFERIDA

50 **[0030]** Los principios y operación de la presente invención se pueden entender mejor con referencia a las figuras y descripciones adjuntas.

55 **[0031]** Antes de explicar al menos una realización de la invención con detalle, debe entenderse que la invención no está limitada en su aplicación a los detalles de la construcción y la disposición de los componentes indicados en la siguiente descripción siguiente o ilustrados en los dibujos descritos en la sección de Ejemplos.

60 **[0032]** Como se describe en la sección Ejemplos más adelante, los presentes inventores han descubierto una nueva proteína constituyente del proceso angiogénico.

65 **[0033]** Esta proteína, que se denomina LOR-1 (SEC ID N° 2) en el presente documento pertenece a la familia de enzimas de las lisil oxidasas que catalizan la formación de enlaces covalentes entre residuos de lisina en colágeno adyacente o fibrillas de elastina. La familia de las lisil oxidasas incluye cuatro genes (27, 28, 32, 33), cuyas

secuencias proteicas se presentan en las SEC ID N° 3, 6, 8 y 9. En la Figura 8 se presenta una comparación de homologías entre varios miembros de la familia de las lisil oxidasas que se describe adicionalmente en la sección Ejemplos más adelante.

5 **[0034]** Cada miembro de la familia de enzimas de las lisil oxidasas incluye un dominio de lisil oxidasa altamente conservado cuya actividad depende considerablemente de la presencia de cobre.

10 **[0035]** Cabe indicar que en estudios de la técnica anterior se ha demostrado que la eliminación de cobre de los tejidos tumorales conduce a la inhibición de la angiogénesis (30, 34). Esto además corrobora el papel de la familia de enzimas de las lisil oxidasas en la angiogénesis, ya que, posiblemente, la eliminación del cobre conduce a la inhibición de las lisil oxidasas.

15 **[0036]** Los ensayos de unión de PF4-LOR-1 presentados en el presente documento proporcionan soporte adicional a la actividad angiogénica de lisil oxidasas. Como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, el PF4 es un inhibidor de la angiogénesis. Por tanto, la actividad antiangiogénica exhibida por PF4 puede efectuarse a través de la inhibición de LOR-1, que, como se demuestra en la sección Ejemplos más adelante, se expresa considerablemente en las células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos.

20 **[0037]** Por tanto, según un aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento de modular la angiogénesis.

25 **[0038]** El procedimiento se efectúa administrando en el tejido de mamífero una molécula capaz de modificar un nivel tisular y/o la actividad de al menos un tipo de lisil oxidasa para modular de este modo la angiogénesis en el tejido de mamíferos.

30 **[0039]** Como se usa en el presente documento, la expresión "nivel tisular" se refiere al nivel de proteína lisil oxidasa presente en forma activa en el tejido en un punto de tiempo determinado. Los niveles de proteína vienen determinados por factores tales como, las velocidades de transcripción y/o traducción, el recambio del ARN o la proteína y/o la localización de la proteína dentro de la célula. Por tanto, cualquier molécula que realice cualquiera de estos factores puede modificar el nivel tisular de la lisil oxidasa.

35 **[0040]** Como se usa en el presente documento, el término "actividad" se refiere a una actividad enzimática de la lisil oxidasa. Una molécula que puede modificar la actividad enzimática puede alterar, directa o indirectamente, la especificidad del sustrato de la enzima o la actividad del sitio catalítico de la misma.

40 **[0041]** Existen numerosos ejemplos de moléculas que puede modificar específicamente el nivel tisular y/o la actividad de una lisil oxidasa. Dichas moléculas se pueden clasificar en "reguladores por aumento" o "reguladores por disminución" de la lisil oxidasa.

#### 40 **Reguladores por disminución**

45 **[0042]** Se puede usar un anticuerpo (policlonal, monoclonal o mono-específico) o una parte de anticuerpo (por ejemplo, fragmento Fab) dirigido a al menos una parte de una lisil oxidasa (por ejemplo, región que abarca el sitio catalítico) para inhibir específicamente la actividad de lisil oxidasa cuando se introduce en el tejido de mamífero, por tanto, se puede usar un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo dirigido a una lisil oxidasa para suprimir o detener la formación de vasos sanguíneos.

50 **[0043]** En la técnica se conocen numerosos ejemplos de inhibidores de anticuerpos, incluidos inhibidores de la angiogénesis que dirigen factores angiogénicos (14,15).

**[0044]** Como se describe más adelante, se pueden usar varias estrategias antisentido o de ribozimas para reducir o anular la transcripción o la traducción de una lisil oxidasa.

55 **[0045]** Una molécula antisentido que se puede usar con la presente invención incluye un polinucleótido o un análogo de polinucleótido de al menos 10 bases, preferiblemente entre 10 y 15, más preferiblemente entre 50 y 20 bases, lo más preferiblemente al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 22, al menos 25, al menos 30 o al menos 40 bases, que se puede hibridar in vivo, en condiciones fisiológicas, con una parte de una cadena polinucleotídica que codifica un polipéptido con una homología de al menos 50 % con las SEC ID N° 1, 4, 5 ó 7 o con una homología de al menos el 75 % con una parte en el extremo N terminal del mismo según se determine usando el software BestFit del paquete para el análisis de la secuencia Wisconsin, usando el algoritmo de Smith y Waterman, en que la penalización por creación de hueco es igual a 8 y la penalización por extensión de hueco es igual a 2.

65 **[0046]** Los oligonucleótidos antisentido se pueden expresar a partir de una construcción de ácido nucleico administrada en el tejido, en cuyo caso preferiblemente se usan promotores inducibles de modo que la expresión de antisentido se pueda activar o desactivar o, como alternativa, dichos oligonucleótidos se pueden sintetizar

químicamente y administrar directamente en el tejido, como parte de, por ejemplo, una composición farmacéutica.

**[0047]** La capacidad de sintetizar químicamente oligonucleótidos y análogos de los mismos que tienen una secuencia predeterminada seleccionada ofrece medios para modular por disminución la expresión génica. Se pueden considerar tres tipos de estrategias de modulación de la expresión génica.

**[0048]** A nivel de transcripción, los oligonucleótidos antisentido o sentido o análogos que se unen al ADN genómico mediante desplazamiento de cadena o la formación de una triple hélice pueden impedir la transcripción. A nivel del transcrito, los oligonucleótidos antisentido o análogos que se unen a las moléculas de ARN diana conducen a la escisión enzimática del híbrido mediante la ARNasa H intracelular. En este caso, hibridándose al ARN diana, los oligonucleótidos o análogos de oligonucleótido proporcionan un híbrido de doble cadena reconocido y destruido por la enzima ARNasa H. Como alternativa, dicha formación de híbridos puede conducir a interferencias con el corte y empalme correcto. Como resultado, en ambos casos, se reduce o elimina el número de transcritos intactos del ARNm diana listos para traducir. A nivel de traducción, los oligonucleótidos antisentido o análogos que se unen a las moléculas de ARNm diana evitan, mediante impedimento estérico, la unión de los factores de traducción esenciales (ribosomas) al ARNm diana, un fenómeno conocido en la técnica como detención de la hibridación, desactivando la traducción de dichos ARNm.

**[0049]** En varios estudios de la técnica anterior se ha demostrado que los oligonucleótidos antisentido pueden ser eficaces in vivo. Por ejemplo, se han usado moléculas antisentido para detener la proliferación (58), el crecimiento (59) o la entrada en la fase S del ciclo celular (60) de células hematopoyéticas y para impedir las respuestas medidas por receptor (61).

**[0050]** Se deben tener en cuenta varias consideraciones al diseñar los oligonucleótidos antisentido. Para una inhibición eficaz in vivo de la expresión génica usando oligonucleótidos antisentido o análogos, los oligonucleótidos o análogos deben cumplir los siguientes requisitos (i) suficiente especificidad en la unión a la secuencia diana; (ii) solubilidad en agua; (iii) estabilidad contra las nucleasas intra y extracelulares; (iv) capacidad de penetración a través de la membrana celular y (v) cuando se usa para tratar un organismo, toxicidad baja.

**[0051]** Los oligonucleótidos no modificados son, normalmente, poco prácticos para usar como secuencias antisentido, ya que tienen semividas in vivo cortas durante las cuales se degradan rápidamente por acción de las nucleasas. Además, son difíciles de preparar en cantidades superiores a miligramos. Adicionalmente, dichos oligonucleótidos atraviesan mal la membrana celular.

**[0052]** Por tanto, es evidente que, con el fin de cumplir todos los requisitos indicados anteriormente, los análogos de nucleótidos tienen que concebirse de un modo adecuado.

**[0053]** Por ejemplo, los problemas que surgen en relación con el reconocimiento del ADN bicatenario (ADNs) a través de la formación de la triple hélice se han disminuido mediante una unión química inteligente de "retrodesplazamiento", mediante lo cual se reconoce una secuencia de polipurina en una cadena y, mediante "retrodesplazamiento" se puede reconocer una secuencia de homopurina en la otra cadena. Además, se ha obtenido una buena formación de hélice usando bases artificiales, mejorando de este modo las condiciones de unión con respecto a la fuerza iónica y el pH.

**[0054]** Además, con el fin de mejorar la semivida así como una penetración de la membrana, se han realizado un gran número de variaciones en las estructuras polinucleotídicas, aunque con poco éxito.

**[0055]** Los oligonucleótidos se pueden modificar en la base, el azúcar o el grupo fosfato. Estas modificaciones incluyen, por ejemplo, el uso de metilfosfonatos, monotiofosfonatos, ditiofosfonatos, fosforoamidatos, ésteres de fosfato, fosforotioatos con puente, fosforoamidatos con puente, metilfosfonatos con puente, análogos de defosfointernucleótidos con puentes de siloxano, puentes de carbonato, puentes de éster de carboximetilo, puentes de carbonato, puentes de éster de carboximetilo, puentes de acetamida, puentes de carbamato, puentes de tioéter, puentes sulfoxi, puentes sulfona, varios ADN de "plástico", puentes anoméricos y derivados de borano (62).

**[0056]** La solicitud de patente internacional WO 89/12060 describe varios bloques estructurales para sintetizar análogos de oligonucleótidos, así como análogos de oligonucleótidos formados uniendo dichos bloques estructurales en una secuencia definida. Los bloques estructurales pueden ser "rígidos" (es decir, que contienen una estructura en anillo) o "flexibles" (es decir, carecen de una estructura en anillo). En ambos casos, los bloques estructurales contienen un grupo hidroxilo y un grupo mercapto, a través de los cuales se supone que los bloques estructurales se unen para formar análogos de oligonucleótidos. El grupo de unión en los análogos de oligonucleótidos se selecciona del grupo que consiste en sulfuro (-S), sulfóxido (-SO-) y sulfona (-SO<sub>2</sub>-).

**[0057]** La solicitud de patente internacional WO 92/20702 describe un oligonucleótido acíclico que incluye una estructura peptídica sobre la cual cualquier nucleobase o análogo químico seleccionado están en forma de cuerdas y sirven como caracteres de codificación como lo son en el ADN o ARN natural. Estos nuevos compuestos, conocidos como ácidos nucleicos peptídicos (PNA) no solo son más estables en las células que sus homólogos

naturales, sino que también se unen a ADN y ARN natural de 50 a 100 veces más fuertemente que los ácidos nucleicos adheridos entre sí. Los oligómeros de PNA se pueden sintetizar a partir de cuatro monómeros protegidos que contienen timina, citosina, adenina y guanina mediante síntesis peptídica de Merrifield en fase sólida. Con el fin de incrementar la solubilidad en agua y de impedir la agregación, se introduce un grupo amida de lisina en la región C-terminal.

**[0058]** Por tanto, la tecnología antisentido requiere el apareamiento del ARN mensajero con un oligonucleótido para formar una doble hélice que inhibe la traducción. El concepto de la terapia génica mediada por antisentido ya se introdujo en 1978 para la terapia del cáncer. Esta estrategia se basó en ciertos genes que son cruciales en la división y crecimiento celular de las células de cáncer. Los fragmentos sintéticos de ADN de la sustancia genética pueden alcanzar este objetivo. Dichas moléculas se unen a las moléculas del gen diana en el ARN de las células tumorales, inhibiendo así la traducción de los genes y dando lugar a un crecimiento disfuncional de estas células. También se han propuesto otros mecanismos. Estas estrategias se han usado con cierto éxito en el tratamiento de cánceres, así como de otras enfermedades, incluidas enfermedades víricas y otras enfermedades infecciosas.

**[0059]** Normalmente, los oligonucleótidos antisentido se sintetizan en longitudes de 13-30 nucleótidos. La vida de las moléculas oligonucleotídicas en sangre es bastante corta. Por tanto, tienen que modificarse químicamente para evitar la destrucción mediante nucleasas ubicuas presentes en el cuerpo. Los fosforotioatos son una modificación muy usada en los ensayos clínicos en curso con oligonucleótidos antisentido. Una nueva generación de moléculas antisentido consiste en oligonucleótidos antisentido híbridos con una parte central de ADN sintético mientras que cuatro bases en cada extremo se han modificado con 2'-O-metilribosa para simular el ARN. En estudios preclínicos en animales de laboratorio, dichos compuestos han demostrado mayor estabilidad al metabolismo en los tejidos corporales y un mejor perfil de seguridad en comparación con los fosforotioatos no modificados de primera generación. También se han analizado docenas de análogos nucleotídicos en la tecnología antisentido.

**[0060]** Los oligonucleótidos de ARN también se pueden usar para inhibición antisentido, ya que forman una cadena doble de ARN-ARN estable con la diana, lo que sugiere una inhibición eficaz. No obstante, debido a su baja estabilidad, los oligonucleótidos de ARN normalmente se expresan dentro de las células usando vectores diseñados a este fin. Esta estrategia se ve favorecida cuando se intenta dirigir a un ARNm que codifica una proteína abundante y duradera.

**[0061]** Los oligonucleótidos de ARN también se pueden diseñar para activar los mecanismos de interferencia de ARN dentro de la célula (ARNi). Los oligonucleótidos adecuados para este fin deben tener una longitud y un área de complementación definidas (63).

**[0062]** En publicaciones científicas recientes se ha validado la eficacia de los compuestos antisentido en modelos animales de hepatitis, cánceres, restenosis de las arterias coronarias y otras enfermedades. Recientemente la FDA ha aprobado el primer fármaco antisentido. El fármaco, Fomivirsen, desarrollado por Isis, está indicado para el tratamiento local del citomegalovirus en pacientes con SIDA que son intolerantes o tienen una contraindicación a otros tratamientos para la retinitis por CMV o que habían respondido de forma insuficiente a tratamientos previos para la retinitis por CMV (Pharmacotherapy News Network).

**[0063]** Actualmente hay varios compuestos antisentido en ensayos clínicos en EE.UU. Estos incluyen antivirales administrados localmente, agentes terapéuticos sistémicos para el cáncer. Los agentes terapéuticos antisentido tienen el potencial de tratar muchas enfermedades potencialmente mortales con una serie de ventajas sobre los fármacos tradicionales. Los fármacos tradicionales intervienen después de que se forme una proteína causante de la enfermedad. No obstante, los agentes terapéuticos antisentido bloquean la transcripción/traducción del ARNm e intervienen antes de que se forme una proteína y, dado que los agentes terapéuticos antisentido están dirigidos solo a un ARNm específico, deberían ser más eficaces con menos efectos secundarios que la terapia actual inhibidora de proteínas.

**[0064]** Una segunda opción para alterar la expresión génica a nivel de la transcripción usa oligonucleótidos sintéticos capaces de hibridar con el ADN bicatenario. Se forma una triple hélice. Dichos oligonucleótidos pueden evitar la unión de los factores de transcripción al promotor del gen y, por tanto, inhibir la transcripción. Como alternativa, pueden evitar el desenrollamiento de la doble cadena y, por tanto, la transcripción de los genes dentro de la estructura de la triple hélice.

**[0065]** Las ribozimas también se pueden usar como reguladores por disminución. Las ribozimas se usan cada vez más para la inhibición específica de secuencia de la expresión génica mediante la escisión de los ARNm que codifican las proteínas de interés. La posibilidad de diseñar ribozimas para escindir cualquier ARN diana específico las ha convertido en herramientas valiosas en aplicaciones de investigación básica y terapéuticas. En el área terapéutica se han explotado las ribozimas para dirigirse a ARN virales en enfermedades infecciosas, oncogenes dominantes en cánceres y mutaciones somáticas específicas en trastornos genéticos. De un modo más importante, varios protocolos para terapia génica con ribozimas para pacientes con VIH ya están en los ensayos de Fase 1 (67). Más recientemente, se han usado ribozimas para investigación con animales transgénicos, validación de dianas génicas y descubrimiento de mecanismos. Varias ribozimas están en diversas etapas de ensayos clínicos.

ANGIOZYME fue la primera ribozima sintetizada químicamente en estudiarse en ensayos clínicos con humanos. ANGIOZYME inhibe específicamente la formación del VEGF-r (receptor del factor de crecimiento endotelial vascular), un componente clave en el mecanismo de la angiogénesis. Ribozyme Pharmaceuticals, Inc., así como otras empresas, han demostrado la importancia de los agentes terapéuticos contra la angiogénesis en modelos animales. HEPTAZYME, una ribozima diseñada para destruir de forma selectiva el ARN del virus de la hepatitis C (VHC), se encontró que era eficaz en la disminución del ARN viral de la hepatitis C en ensayos de cultivo celular (Ribozyme Pharmaceuticals, Incorporated) .

**[0066]** Los reguladores por disminución descritos en el presente documento anteriormente serían particularmente útiles para inhibir la angiogénesis en tejido tumoral. Se ha demostrado que el PF4, una proteína de unión a la lisil oxidasa que inhibe la angiogénesis en tejido tumoral se acumula específicamente en vasos sanguíneos tumorales recién formados (vasos angiogénicos), pero no en vasos sanguíneos establecidos (31, 35) .

**[0067]** Los vasos sanguíneos angiogénicos recién formados son más permeables a las proteínas que los vasos sanguíneos establecidos porque el principal inductor de la angiogénesis en muchas enfermedades angiogénicas es VEGF, un factor de crecimiento que también funciona como un potente factor de permeabilización de vasos sanguíneos (VPF) (13). Por tanto, los vasos sanguíneos asociados con tumores están en un estado permanente de hiperpermeabilidad debido a la alteración de la regulación de la sobreexpresión de VEGF (36, 37) y, por tanto, una molécula reguladora por disminución usada mediante el procedimiento de la presente invención sería capaz de extravasarse de forma eficaz de los vasos sanguíneos tumorales, pero con mucha menos eficacia de los vasos sanguíneos estabilizados normales.

#### ***Reguladores por incremento***

**[0068]** Pueden utilizarse varias estrategias para aumentar los niveles de lisil oxidasa y, por tanto, aumentar la formación de vasos sanguíneos.

**[0069]** Por ejemplo, puede administrarse a un tejido de mamífero una construcción de ácido nucleico que incluye un promotor constitutivo, inducible o específico de tejido situado en dirección 5' de un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad de lisil oxidasa, tal como el polipéptido representado en SEQ ID NO: 2, 3, 6, 8 ó 9. La lisil oxidasa expresada por esta construcción aumentaría sustancialmente los niveles de lisil oxidasa en el interior de las células del tejido y, por tanto, aumentar la angiogénesis.

**[0070]** Los segmentos de polinucleótidos que codifican la lisil oxidasa pueden ligarse en un sistema adecuado de vectores de expresión disponible comercialmente para transformar células de mamífero y para dirigir la expresión de esta enzima dentro de las células transformadas. Se entenderá que dichos sistemas de vectores disponibles comercialmente pueden modificarse fácilmente mediante técnicas recombinantes utilizadas habitualmente con el fin de reemplazar, duplicar o mutar secuencias promotoras o potenciadoras existentes y/o introducir cualquiera secuencia de polinucleótido adicional.

**[0071]** Los vectores de expresión de mamífero adecuados incluyen, pero sin limitación, pcDNA3, pcDNA3.1(+/-), pZeoSV2(+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, que están disponibles de Invitrogen, pCI que está disponible de Promega, pBK-RSV y pBK-CMV que están disponibles de Stratagene, pTRES que está disponible de Clontech, y sus derivados.

**[0072]** Pueden utilizarse también técnicas de "knock-in" de genes para aumentar los niveles de expresión de la lisil oxidasa.

**[0073]** Se pueden someter a "knock in" elementos potenciadores adyacentes a secuencias codificantes de lisil oxidasa endógenas para aumentar así la transcripción a partir de las mismas.

**[0074]** En las referencias 64-66 se proporcionan detalles adicionales concernientes a la construcción y uso de construcciones con "knock-out" y "knock-in".

**[0075]** Se entenderá que la administración directa de un polipéptido que exhibe actividad de lisil oxidasa puede utilizarse también para aumentar la angiogénesis.

**[0076]** Se entenderá que pueden utilizarse ensayos de unión por afinidad y/o ensayos de actividad, cuyos principios son bien conocidos en la técnica, para el cribado de nuevos compuestos (v.g., análogos de sustratos) que pueden regular específicamente la actividad de lisil oxidasa y, por tanto, pueden utilizarse con la presente invención.

**[0077]** Un ensayo adecuado para usar con este aspecto de la presente invención se ha descrito previamente en un estudio realizado por Bedell-Hogan et al. (68).

**[0078]** Con el fin de modular la angiogénesis, las moléculas reguladoras por incremento/disminución se pueden administrar al individuo per se o en una composición farmacéutica, en la que se mezclan con vehículos o excipientes



adecuados.

**[0079]** Como se usa en el presente documento, una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los principios activos descritos en el presente documento con otros componentes químicos, tales como vehículos y excipientes fisiológicamente adecuados. La finalidad de una composición farmacéutica es facilitar la administración/dirigir un compuesto a un mamífero.

**[0080]** Como se usa en el presente documento, la expresión "principios activos" se refiere a la preparación responsable del efecto biológico, es decir las moléculas reguladoras por incremento/disminución usadas por la presente invención.

**[0081]** En lo sucesivo en el presente documento, las expresiones "vehículo fisiológicamente aceptable" y "vehículo farmacéuticamente aceptable" se usan de forma intercambiable para hacer referencia a un vehículo, tal como, por ejemplo, un liposoma, un virus, una micela o una proteína o un diluyente que no produzca irritación significativa en el mamífero y no anule la actividad biológica y las propiedades del principio activo. En estas expresiones se incluye un adyuvante.

**[0082]** En el presente documento, el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un principio activo. Ejemplos, sin limitación, de excipientes incluyen carbonato cálcico, fosfato cálcico, varios azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

**[0083]** Las técnicas de formulación y administración de composiciones se pueden encontrar en la última edición de "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA, que se incorpora en el presente documento por referencia.

**[0084]** Las vías de administración adecuadas pueden incluir, por ejemplo, administración oral, rectal, transmucosa, transnasal, intestinal o parenteral, incluidas inyecciones intramusculares, subcutáneas e intramedulares, así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares.

**[0085]** Para inyección, los principios activos se pueden formular en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hank, solución de Ringer o solución salina tamponada fisiológicamente. Para la administración transmucosa, en la formulación se usan agentes de penetración adecuados para atravesar la barrera. Dichos agentes de penetración se conocen generalmente en la técnica.

**[0086]** Para administración oral, los compuestos se pueden formular fácilmente combinando el principio activo con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Dichos vehículos permiten formular el principio activo de la invención como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones y similares, para la ingestión oral por un paciente. Las preparaciones farmacológicas para uso oral se pueden fabricar usando un excipiente sólido, opcionalmente moliendo la mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, tras añadir las sustancias auxiliares adecuadas, si se desea, para obtener núcleos de comprimidos o núcleos de grageas. Excipientes adecuados son, en concreto, cargas, tales como azúcares, incluidas lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa, tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polímeros fisiológicamente aceptables, tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes, tales como la polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido algínico o una sal de los mismos, tal como alginato de sodio.

**[0087]** Los núcleos de grageas se proporcionan con recubrimientos adecuados. Para este fin, se pueden usar soluciones de azúcar concentradas que opcionalmente pueden contener goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los recubrimientos de comprimidos o grageas para la identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis del compuesto activo.

**[0088]** Las composiciones farmacéuticas que se pueden usar por vía oral incluyen cápsulas duras fabricadas de gelatina, así como cápsulas blandas selladas fabricadas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los principios activos mezclados con una carga, tales como lactosa, aglutinantes, tales como almidones, lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio, y, opcionalmente, estabilizantes. En cápsulas blandas, los principios activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizantes. Todas las formulaciones para administración oral deberán estar en dosis adecuadas para la vía de administración elegida.

**[0089]** Para la administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas formulados de forma convencional.

5 [0090] Las preparaciones descritas en el presente documento se pueden formular para administración parenteral, por ejemplo mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de monodosis en, por ejemplo, ampollas o en envases multidosis con, opcionalmente, un conservante añadido. Las composiciones pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

10 [0091] Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación activa en forma hidrosoluble. Adicionalmente, se pueden preparar suspensiones de los principios activos como suspensiones oleosas o a base de agua para inyección adecuadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos, tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo, triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones inyectables acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol, o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los principios activos para permitir la preparación de soluciones muy concentradas.

15 [0092] Como alternativa, el principio activo puede estar en forma de polvo para reconstituir con un vehículo adecuado, por ejemplo una solución a base de agua apirógena estéril, antes de usar.

20 [0093] La preparación también se puede formular en composiciones rectales, tales como supositorios o enemas de retención, usando, por ejemplo, bases de supositorios convencionales, tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

25 [0094] Las composiciones farmacéuticas adecuadas para usar en el contexto de la presente invención incluyen composiciones en las que los principios activos están contenidos en una cantidad eficaz para alcanzar el propósito previsto.

30 [0095] La composición farmacéutica puede formar una parte de un artículo de fabricación, que también incluye un material de envasado para contener la composición farmacéutica y un folleto que proporciona indicaciones de uso para la composición farmacéutica,

[0096] Por tanto, la presente memoria proporciona un procedimiento y composiciones farmacéuticas útiles que modulan la angiogénesis.

35 [0097] Dicha actividad de modulación se puede usar para tratar la artritis (38, 39), la retinopatía diabética (40), la psoriasis (41, 42) y la vasculitis (43, 44).

[0098] Además, la presente memoria también se puede utilizar para tratar la enfermedades caracterizadas por vasos sanguíneos frágiles, que incluyen el síndrome de Marfan, Kawasaki, Ehlers-Danlos, cutis-laxa y takysu (43, 45-47).

40 [0099] Es posible que algunas de estas enfermedades resulten de una actividad de lisil oxidasa reducida o anulada que conduce a la síntesis de una matriz extracelular frágil, y consecuentemente, vasos sanguíneos frágiles.

45 [0100] Por tanto, se puede usar la administración de secuencias que codifican lisil oxidasas o de polipéptidos para corregir algunas de las manifestaciones de estas enfermedades.

50 [0101] La presente memoria también se puede utilizar para tratar enfermedades que se caracterizan por cambios en la pared de los vasos sanguíneos. Por ejemplo, la restenosis que es una complicación habitual después de la terapia con balón, la displasia fibromuscular (49) y la estenosis aórtica (50) son todas potencialmente tratables por el procedimiento de la presente invención.

55 [0102] Además, las evidencias presentadas en la sección Ejemplos que indican que LOR-1 puede expresarse más en las líneas celulares metastásicas que en las líneas celulares no metastásicas (Figura 3), sugieren que se pueden usar los niveles de expresión de LOR-1 como herramienta de diagnóstico para determinar el carácter maligno de las células cancerosas y, por tanto, para determinar qué régimen de tratamiento debería usarse.

60 [0103] Otros objetos, ventajas y características nuevas de la presente memoria serán obvias para los expertos en la materia a partir del análisis de los ejemplos siguientes que no se pretende que sean limitantes. Adicionalmente, cada una de las diversas realizaciones y aspectos de la presente invención que se han indicado anteriormente en el presente documento y según se reivindica en la sección de reivindicaciones más adelante tiene base experimental en los ejemplos siguientes.

## EJEMPLOS

65 [0104] En general, la nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio usados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas se explican exhaustivamente en la literatura. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual"

Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laborator y Press, New York (1998); metodologías como se indican en las patentes de EE.UU. nº 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds) , "Basic and Clinical Immunology" (8ª Edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman y Co., New York (1980); los inmunoensayos disponibles se describen extensamente en la patente y la literatura científica, véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nº 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization -A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). Otras referencias generales se proporcionan a lo largo del presente documento. Se cree que los procedimientos en los mismos son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para comodidad del lector.

## EJEMPLO 1

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

**[0105]** Se realizó un estudio en un esfuerzo para confirmar y caracterizar adicionalmente el papel de la LOR-1 en la angiogénesis.

#### *Materiales y procedimientos*

**[0106]** El factor 4 de plaquetas recombinante humano (PF4, Número de Acceso en GenBank M20901), que se produjo en bacterias y posteriormente se replegó, fue suministrado por el Dr. Maione of Repligen Corp. (Boston, EE.UU.). Los pélets de liberación lenta de estrógenos se obtuvieron en Innovative Research of America, Sarasota, FL, EE.UU.

**[0107] Construcción del vector de expresión de LOR-1, transfección en células MCF7 y expresión:** El ADNc de LOR-1 (SEC ID Nº 1) se clonó en un vector de expresión pCDNA3.1-hygro (Invitrogen Inc., EE.UU.) bajo el control de un promotor de CMV. Los clones de las células que expresan LOR-1 se seleccionaron usando higromicina y se analizó la expresión de LOR-1 usando el antisuero policlonal descrito más adelante.

**[0108] Construcción de las columnas de afinidad para el factor 4 de plaquetas y purificación de LOR-1 en dichas columnas:** El PF4 se acopló a sefarosa usando una modificación del procedimiento de Miron y Wilchek (51) como se ha descrito previamente para el factor de crecimiento endotelial vascular (52). Se recogió medio acondicionado sin suero de células MCF-7 marcadas con <sup>35</sup>S-metionina que sobreexpresaban LOR-1. El medio acondicionado se pasó por la columna dos veces. La columna se lavó con solución salina tamponada con fosfato (NaCl 300 mM, pH-7,2) y se eluyó con PBS (que contenía NaCl 2M) .

**[0109] Experimentos con ratones desnudos:** Se implantaron células MCF-7 modificadas o parentales (10<sup>7</sup> células por animal) bajo la piel de ratones desnudos. Se implantó un pélet de liberación lenta de estrógenos a 1 cm de lo descrito anteriormente (53). Los tumores se midieron periódicamente, tras lo cual se extrajeron los tumores de al menos 1 cm de tamaño y se analizaron inmunohistológicamente usando un anticuerpo comercial dirigido contra un antígeno de tipo factor 8 que sirvió como marcador específico para las células endoteliales.

**[0110] Hibridación in situ:** Los fragmentos que abarcan los nucleótidos 922-1564 de LOR-1, los nucleótidos 976-1391 de LOL, los nucleótidos 400-950 de LO y los nucleótidos 1061-1590 de LOR-2 (numerados desde el codón ATG de estas secuencias) se subclonaron cada uno de forma independiente en los vectores Bluescript SK y KS (Stratagene). Se usó un kit de marcaje de ARNc DIG de Boehringer-Mannheim para transcribir las sondas de ARNc sentido (s) y antisentido (as) marcadas con digoxigenina del promotor de T7 de las construcciones Bluescript. La hibridación y la posterior detección de las sondas hibridadas se llevó a cabo esencialmente como se ha descrito anteriormente (54).

**[0111] Antiseros policlonales anti-LOR-1:** Los antiseros se generaron inyectando un péptido recombinante que contiene los 200 aminoácidos del extremo C de LOR-1 (aminoácidos 540-744 de la SEC ID Nº 2) en conejos hembra. El suero se recogió 10 días después de cada inyección y una fracción de inmunoglobulina se purificó usando una columna de afinidad de proteína A sefarosa (Farmacia) .

#### *Resultados*

[0112] **Purificación de LOR-1:** Se usó una columna de afinidad de PF4 para detectar proteínas de células endoteliales que interaccionen específicamente con PF4.

5 [0113] Se detectaron dos proteínas de unión a PF4 en medio acondicionado de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), mientras que no se detectaron proteínas de unión a PF4 en extractos de detergente de células endoteliales.

10 [0114] Dos litros de medio acondicionado permitieron una purificación parcial de una de estas proteínas de unión que eluyó de la columna a concentraciones de sales relativamente altas (NaCl 0,4 -0,5 M) .

15 [0115] Se realizó una purificación adicional de esta proteína usando cromatografía líquida de alta presión de fase inversa y cromatografía en SDS/PAGE. La proteína de unión a PF4 no se unió a heparina ni era un proteoglicano de heparán sulfato ya que la digestión con heparinasa no pudo cambiar su movilidad en los experimentos de SDS/PAGE.

20 [0116] La secuenciación parcial y la comparación de bases de datos revelaron que la proteína de unión a PF4 de la presente invención (LOR-1) pertenece a una familia de proteínas que contienen un dominio similar a la lisil oxidasa (28, 29). Las lisil oxidasas son enzimas dependientes de cobre que participan en la síntesis de la matriz extracelular catalizando la formación de enlaces covalentes entre lisinas de fibras de colágeno o de elastina adyacentes.

25 [0117] La secuencia de aminoácidos de longitud completa de LOR-1 (deducida a partir de la secuencia de ADNc aislada) mostró un alto grado de identidad con WS9-14, una proteína sobreexpresada en fibroblastos senescentes, en varios tipos de células adherentes (pero no en células no adherentes) y en fibroblastos, en los que se correlacionó con los niveles de expresión de pro-colágeno I- $\alpha$ 1, además de ser inducida por el TGF- $\beta$  e inhibida por ésteres de forbol y ácido retinoico (27).

30 [0118] **El papel de LOR-1 en el desarrollo del tumor:** La LOR-1 recombinante se expresó en células PAE unidas específicamente con la columna de afinidad de PF4 (Figura 1). Dado que LOR-1 es un miembro de la familia de LO, se postuló la hipótesis de que participa en la formación de MEC durante la angiogénesis. Además, también se postuló la hipótesis de que el PF4 suprime o inhibe la actividad proangiogénica de LOR-1, inhibiendo así las etapas posteriores de la formación de vasos sanguíneos y, como resultado, limitando el crecimiento del tumor.

35 [0119] **Expresión de LOR-1:** La hibridación in situ demostró que LOR-1 se expresa en una amplia variedad de tejidos y tipos de células, incluidos fibroblastos, adipocitos, células nerviosas, células endoteliales y varias células epiteliales. Varios tipos de células, tales como los hepatocitos hepáticos, no expresaron LOR-1; de los 4 miembros de la familia LO analizados (todos excepto para LoxC), LOR-1 fue la única que se expresó en células endoteliales de los vasos sanguíneos.

40 [0120] **LOR-1 y cáncer.** Como se muestra en la Figura 2, en el presente documento se demostró una correlación directa entre los niveles de expresión de LOR-1 y las propiedades metastásicas de las líneas celulares derivadas de cáncer de mama.

45 [0121] Dado que las células epiteliales que revisten los conductos galactóforos del tejido de mama normal (de los que surgen la mayoría de los tumores de mama) expresan grandes cantidades de LOR-1, es posible que las líneas menos metastásicas perdieran expresión de LOR-1 en lugar de ganarla.

50 [0122] Para corroborar su papel en la metástasis, el ADNc de LOR-1 se expresó en líneas celulares MCF-7 derivadas de cáncer de mama no metastásico que normalmente no expresan LOR-1. La expresión de LOR-1 se analizó usando anticuerpos policlonales de conejo generados como se ha descrito anteriormente (Figura 3) .

55 [0123] Se implantaron una línea celular control que se transfeccionó con un vector de expresión vacío y una línea celular MCF-7 que expresaba LOR-1 bajo la piel de ratones con deficiencias inmunitarias junto con un pélet de liberación lenta de estrógenos, como se ha descrito anteriormente. Los estrógenos se añadieron porque el desarrollo de tumores a partir de esta línea celular no metastásica depende de estrógenos (55).

60 [0124] La velocidad de desarrollo del tumor en ratones se monitorizó de forma continua (Figura 4); los tumores de 1 cm de tamaño se extirparon y se sometieron a análisis histológico como se ha descrito anteriormente. Es interesante el hecho de que la velocidad del desarrollo tumoral variaba entre las dos líneas celulares, en las que algunos tumores exhibieron un crecimiento más lento en MCF-7 que expresaban LOR-1 y otros exhibían un crecimiento más lento en las células control.

65 [0125] Con el fin de superar los problemas del nivel de expresión, se introdujo el ADNc de LOR-1 bajo el control de un promotor inducido por tetraciclina (el sistema TET-off). Dicha construcción permitirá determinar de forma concluyente si la menor velocidad de crecimiento tumoral observada en las células que expresan LOR esta de hecho causada por LOR-1.

[0126] Los tumores que expresan cantidades grandes de LOR-1 se cortaron y se tiñeron con un anticuerpo dirigido contra el antígeno similar al factor 8, un marcador específico de células endoteliales. El tejido tumoral control se tiñó predominantemente en la cápsula alrededor del tumor, mientras que en los tumores de expresión de LOR-1 se observó una pronunciada tinción en las regiones internas del tejido tumoral (Figura 5a y Figura 5b, respectivamente).

[0127] **El papel de LOR-1 en la enfermedad de Wilson y en otras enfermedades hepáticas crónicas:** El tejido hepático normal y enfermo se sondó con sondas de LOR-1 sentido (Figuras 6a y 6c) y antisentido (Figuras 6b y 6d). Los tejidos hepáticos normales expresan niveles muy bajos de LOR-1 (Figura 6b). No obstante, los tejidos hepáticos fibróticos, tales como los observados en la enfermedad de Wilson exhiben un fuerte incremento de la expresión de LOR-1 en hepatocitos (Figuras 6d).

[0128] **Expresión de LOR-1 en embriones de pollo:** La Figura 7 ilustra expresión de LOR-1 de ARNm de LOR-1 en vasos sanguíneos de un embrión de pollo en desarrollo. La hibridación in situ de toda la cantidad de embriones de pollo de 4 días de edad reveló la expresión de ARNm de LOR-1 en vasos sanguíneos localizados en el amnios (flecha).

[0129] **La familia de las lisil oxidadasas:** Una comparación de la homología entre cinco miembros de la familia de las lisil oxidadasas, que incluye la subfamilia LO y LOL y la subfamilia LOR-1 y LOR-2, reveló una fuerte homología en la parte C-terminal, que incluye el motivo de la lisil oxidasa conservado. LOR-1 y LOR-2 se caracterizan por tramos largos en N-terminal que no se encuentran en LO y LOL.

[0130] Aunque la presente invención se ha descrito conjuntamente con realizaciones específicas de la misma, es evidente que muchas alternativas, modificaciones y variaciones serán evidentes para los expertos en la materia.

#### REFERENCIAS CITADAS

(Referencias adicionales se citan en el texto)

#### [0131]

1. Folkman, J. (1990) What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent. J. Nat. Cancer Inst. 82, 4-7.
2. Hanahan, D. y Folkman, J. (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell 86, 353-364.
3. Boehm, T., Folkman, J., Browder, T., y O'Reilly, M. S. (1997) Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. Nature 390, 404-407.
4. Bergers, G., Javaherian, K., Lo, K. M., Folkman, J., y Hanahan, D. (1999) Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. Science 284, 808-812.
5. Zetter, B. R. (1998) Angiogenesis and tumor metastasis. Annu. Rev. Med. 49:407-424,407-424.
6. Weidner, N. (1998) Tumoural vascularity as a prognostic factor in cancer patients: The evidence continues to grow. J. Pathol. 184, 119-122.
7. Degani, H., Gusic, V., Weinstein, D., Fields, S., y Strano, S. (1997) Mapping pathophysiological features of breast tumors by MRI at high spatial resolution. Nature Med. 3, 780-782.
8. Guidi, A. J., Schnitt, S. J., Fischer, L., Tognazzi, K., Harris, J. R., Dvorak, H. F., y Brown, L. F. (1997) Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in patients with ductal carcinoma in situ of the breast. Cancer 80, 1945-1953.
9. Balsari, A., Maier, J. A. M., Colnaghi, M. I., y Menard, S. (1999) Correlation between tumor vascularity, vascular endothelial growth factor production by tumor cells, serum vascular endothelial growth factor levels, and serum angiogenic activity in patients with breast carcinoma. Lab. Invest. 79, 897-902.
10. Klauber, N., Parangi, S., Flynn, E., Hamel, E., y D'Amato, R. J. (1997) Inhibition of angiogenesis and breast cancer in mice by the microtubule inhibitors 2-methoxyestradiol and taxol. Cancer Res. 57, 81-86.
11. Harris, A. L., Zhang, H. T., Moghaddam, A., Fox, S., Scott, P., Pattison, A., Gatter, K., Stratford, I., y Bicknell, R. (1996) Breast cancer angiogenesis - New approaches to therapy via antiangiogenesis, hypoxic activated drugs, and vascular targeting. Breast Cancer Res. Treat. 38, 97-108.
12. Weinstatsaslow, D. L., Zabrenetzky, V. S., Vanhoutte, K., Frazier, W. A., Roberts, D. D., y Steeg, P. S. (1994) Transfection of thrombospondin 1 complementary DNA into a human breast carcinoma cell line reduces primary tumor growth, metastatic potential, and angiogenesis. Cancer Res. 54, 6504-6511.
13. Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., y Poltorak, Z. (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. FASEB J. 13, 9-22.
14. Brooks, P. C., Montgomery, A. M. P., Rosenfeld, M., Reisfeld, R. A., Hu, T. H., Klier, G., y Chersesh, D. A. (1994) Integrin alpha(v)beta(3) antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. Cell 79, 1157-1164.
15. Brooks, P. C., Silletti, S., Von Schalscha, T. L., Friedlander, M., y Chersesh, D. A. (1998) Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity. Cell 92, 391-400.
16. O'Reilly, M. S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W. S., Flynn, E., Birkhead, J. R., Olsen, B. R., and Folkman, J. (1997) Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. Cell 88,277-285.
17. O'Reilly, M. S., Holmgren, L., Chen, C., y Folkman, J. (1996) Angiostatin induces and sustains dormancy of human

- primary tumors in mice. *Nature Med.* 2, 689-692.
18. Tanaka, T., Manome, Y., Wen, P., Kufe, D. W., y Fine, H. A. (1997) Viral vector-mediated transduction of a modified platelet factor 4 cDNA inhibits angiogenesis and tumor growth. *Nature Med.* 3, 437-442.
19. Maione, T. E., Gray, G. S., Petro, J., Hunt, A. J., Donner, A. L., Bauer, S. I., Carson, H. F., y Sharpe, R. J. (1990) Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor-4 and related peptides. *Science* 247, 77-79.
20. Neufeld, G., Akiri, G., y Vadasz, Z. (2000) in *Platelet Factor 4 (PF4). The Cytokine Reference: A compendium of cytokines and other mediators of host defence* (Oppenheim, J. J. y Feldmann, M. eds) Academic Press.
21. Gengrinovitch, S., Greenberg, S. M., Cohen, T., Gitay-Goren, H., Rockwell, P., Maione, T. E., Levi, B., y Neufeld, G. (1995) Platelet factor-4 inhibits the mitogenic activity of VEGF-121 and VEGF-165 using several concurrent mechanisms. *J. Biol. Chem.* 270,15059-15065.
22. Brown, K. J. y Parish, C. R. (1994) Histidine-rich glycoprotein and platelet factor 4 mask heparan sulfate proteoglycans recognized by acidic and basic fibroblast growth factor. *Biochemistry* 33, 13918-13927.
23. Gupta, S. K. y Singh, J. P. (1994) Inhibition of endothelial cell. Proliferation by platelet factor-4 involves a unique action on S phase progression. *J. Cell Biol.* 127, 1121-1127.
24. Watson, J. B., Getzler, S. B., y Mosher, D. F. (1994) Platelet factor 4 modulates the mitogenic activity of basic fibroblast growth factor. *J. Clin. Invest.* 94, 261-268.
25. Maione, T. E., Gray, G. S., Hunt, A. J., y Sharpe, R. J. (1991) Inhibition of tumor growth in mice by an analogue of platelet factor 4 that lacks affinity for heparin and retains potent angiostatic activity. *Cancer Res.* 51,2077-2083.
26. Sharpe, R. J., Byers, H. R., Scott, C. F., Bauer, S. I., y Maione, T. E. (1990) Growth inhibition of murine melanoma and human colon carcinoma by recombinant human platelet factor 4. *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 848-853.
27. Saito, H., Papaconstantinou, J., Sato, H., y Goldstein, S. (1997) Regulation of a novel gene encoding a lysyl oxidase-related protein in cellular adhesion and senescence. *J. Biol. Chem.* 272, 8157-8160.
28. Kim, Y., Boyd, C. D., y Csiszar, K. (1995) A new gene with sequence and structural similarity to the gene encoding human lysyl oxidase. *J. Biol. Chem.* 270, 7176-7182.
29. Kim, Y. H., Peyrol, S., So, C. K., Boyd, C. D., y Csiszar, K. (1999) Coexpression of the lysyl oxidase-like gene (LOXL) and the gene encoding type III procollagen in induced liver fibrosis. *J. Cell Biochem.* 72, 181-188.
30. Rabinovitz, M. (1999) Angiogenesis and its inhibition: the copper connection. *J. Natl. Cancer Inst.* 91, 1689-1690.
31. Hansell, P., Maione, T. E., y Borgstrom, P. (1995) Selective binding of platelet factor 4 to regions of active angiogenesis in vivo. *Amer. J. Physiol-Heart. Circ. Phy.* 38, H829-H836.
32. Reiser, K., McCormick, R. J., y Rucker, R. B. (1992) Enzymatic and nonenzymatic cross-linking of collagen and elastin. *FASEB J.* 6,2439-2449.
33. Jang, W., Hua, A., Spilson, S. V., Miller, W., Roe, B. A., y Meisler, M. H. (1999) Comparative sequence of human and mouse BAC clones from the mnd2 region of chromosome 2p13. *Genome Res.* 9,53-61.
34. Yoshida, D., Ikeda, Y., y Nakazawa, S. (1995) Copper chelation inhibits tumor angiogenesis in the experimental 9L gliosarcoma model. *Neurosurgery* 37, 287-292.
35. Borgstrom, P., Discipio, R., y Maione, T. E. (1998) Recombinant platelet factor 4, an angiogenic marker for human breast carcinoma. *Anticancer Res.* 18, 4035-4041.
36. Shweiki, D., Neeman, M., Itin, A., y Keshet, E. (1995) Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: Implications for tumor angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 768-772.
37. Rak, J., Mitsuhashi, Y., Bayko, L., Filmus, J., Shirasawa, S., Sasazuki, T., y Kerbel, R. S. (1995) Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: Implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 55, 4575-4580.
38. Koch, A. E. (1998) Angiogenesis - Implications for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 41, 951-962.
39. Paleolog, E. M. y Fava, R. A. (1998) Angiogenesis in rheumatoid arthritis: implications for future therapeutic strategies. *Springer Semin. Immunopathol.* 20, 73-94.
40. Miller, J. W., Adamis, A. P., y Aiello, L. P. (1997) Vascular endothelial growth factor in ocular neovascularization and proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Metab. Rev.* 13, 37-50.
41. Detmar, M., Brown, L. F., Claffey, K. P., Yee, K. T., Kocher, O., Jackman, R. W., Berse, B., y Dvorak, H. F. (1994) Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis. *J. Exp. Med.* 180, 1141-1146.
42. Creamer, D., Allen, M. H., Sousa, A., Poston, R., y Barker, J. N. W. N. (1997) Localization of endothelial proliferation and microvascular expansion in active plaque psoriasis. *Br. J. Dermatol.* 136, 859-865.
43. Lie, J. T. (1992) Vasculitis simulators and vasculitis look-alikes. *Curr. Opin. Rheumatol.* 4, 47-55.
44. Klipple, G. L. y Riordan, K. K. (1989) Rare inflammatory and hereditary connective tissue diseases. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 15, 383-398.
45. Brahn, E., Lehman, T. J. A., Peacock, D. J., Tang, C., y Banquerigo, M. L. (1999) Suppression of coronary vasculitis in a murine model of Kawasaki disease using an angiogenesis inhibitor. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 90, 147-151.
46. Cid, M. C., Grant, D. S., Hoffman, G. S., Auerbach, R., Fauci, A. S., y Kleinman, H. K. (1993) Identification of Haptoglobin as an Angiogenic Factor in Sera from Patients with Systemic Vasculitis. *J. Clin. Invest.* 91, 977-985.
47. Hoffman, G. S., Filie, J. D., Schumacher, H. R., Jr., Ortiz-Bravo, E., Tsokos, M. G., Marini, J. C., Kerr, G. S., Ling, Q. H., y Trentham, D. E. (1991) Intractable vasculitis, resorptive osteolysis, and immunity to type I collagen in type VIII Ehlers-Danlos syndrome. *Arthritis Rheum.* 34,1466-1475.
48. Bauters, C. y Isner, J. M. (1997) The biology of restenosis. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 40, 107-116.
49. Begelman, S. M. y Olin, J. W. (2000) Fibromuscular dysplasia. *Curr. Opin. Rheumatol.* 12,41-47.

50. Palta, S., Pai, A. M., Gill, K. S., y Pai, R. G. (2000) New insights into the progression of aortic stenosis: implications for secondary prevention. *Circulation* 101, 2497-2502.
51. Wilchek, M. Miron, T., 1982. Immobilization of enzymes and affinity ligands onto agarose via stable and uncharged carbamate linkages. *Biochem. Int.* 4, 629-635.
- 5 52. Soker, S., Takashima, S., Miao, H. Q., Neufeld, G., Klagsbrun, M., 1998. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92, 735-745.
53. Zhang, H. T., Craft, P., Scott, P. A. E., Ziche, M., Weich, H. A., Harris, A. L., Bicknell, R, 1995. Enhancement of tumor growth and vascular density by transfection of vascular endothelial cell growth factor into MCF-7 human breast carcinoma cells. *J. Nat. Cancer Inst.* 87, 213-219.
- 10 54. Cohen, T., Gluzman-Poltorak, Z., Brodzky, A., Meytal, V., Sabo, E., Misselevich, I., Hassoun, M., Boss, J. H., Resnick, M., Shneyvas, D., Eldar, S., Neufeld, G., 2001. Neuroendocrine Cells along the Digestive Tract Express Neuropilin-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284, 395-403.
55. Mcleskey, S. W., Kurebayashi, J., Honig, S. F., Zwiebel, J., Lippman, M. E., Dickson, R. B., Kern, F. G., 1993. Fibroblast Growth Factor-4 Transfection of MCF-7 Cells Produces Cell Lines That Are Tumorigenic and Metastatic in Ovariectomized or Tamoxifen-Treated Athymic Nude Mice. *Cancer Res.* 53, 2168-2177.
- 15 56. Nakamura et al. *Cancer Res* 60(3), 760-5, 2000.
58. Szczylik et al (1991) Selective inhibition of leukemia cell proliferation by BCR-ABL antisense oligodeoxynucleotides. *Science* 253:562.
59. Calabretta et al. (1991) Normal and leukemic hematopoietic cell manifest differential sensitivity to inhibitory effects of c-myc antisense oligodeoxynucleotides: an in vitro study relevant to bone marrow purging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2351.
- 20 60. Heikhila et al. (1987). A c-myc antisense oligodeoxynucleotide inhibits entry into S phase but not progress from G(0) to G(1). *Nature*, 328:445.
61. Burch y Mahan (1991) Oligodeoxynucleotides antisense to the interleukin I receptor m RNA block the effects of interleukin I in cultured murine and human fibroblasts and in mice. *J. Clin. Invest.* 88:1190.
- 25 62. Cook (1991) Medicinal chemistry of antisense oligonucleotides-future opportunities. *Anti-Cancer Drug Design* 6:585.
63. Carthew RW. Gene silencing by double-stranded RNA. *Curr Opin Cell Biol* 2001 Apr;13(2):244-8.
64. S. y Ikeda, J.E.: Trapping of mammalian promoters by Cre-lox site-specific recombination. *DNA Res* 3 (1996) 73-80.
- 30 65. Bedell, M.A., Jenkins, NA. y Copeland, N.G.: Mouse models of human disease. Part I: Techniques and resources for genetic analysis in mice. *Genes and Development* 11 (1997) 1-11.
66. Bermingham, J.J., Scherer, S.S., O'Connell, S., Arroyo, E., Kalla, K.A., Powell, F.L. y Rosenfeld, M.G.: Tst- 1/Oct-6/SCIP regulates a unique step in peripheral myelination and is required for normal respiration. *Genes Dev* 10 (1996) 1751-62.
- 35 67. Welch P.J., Barber J.R., y Wong-Staal F. (1998) Expression of ribozymes in gene transfer systems to modulate target RNA levels. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 9(5):486-496.
68. Bedell-Hogan, D., Trackman, P., Abrams, W., Rosenbloom, J., y Kagan, H. (1993) Oxidation, cross-linking, and insolubilization of recombinant tropoelastin by purified lysyl oxidase. *J. Biol. Chem.* 268, 10345-10350

**LISTADO DE SECUENCIAS**

**[0132]**

- <110> Neufeld, Gera
- 45 Gengrinovitch, Stela
- akiri, Gal
- Vadaz, Zehava
- <120> COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS Y PROCEDIMIENTOS ÚTILES PARA MODULAR LA
- 50 ANGIOGÉNESIS
- <130> 01/22064
- <150> US 60/223,739
- <151> 2000-08-08
- <160> 9
- <170> PatentIn version 3.1
- 55 <210> 1
- <211> 2325
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- 60 <400> 1

ES 2 440 932 T3

	<b>atggagaggc ctctgtgctc ccacctctgc agctgcctgg ctatgctggc cctcctgtcc</b>	<b>60</b>
5	<b>cccctgagcc tggcacagta tgacagctgg cccattacc ccgagtactt ccagcaaccg</b>	<b>120</b>
	<b>gctcctgagt atcaccagcc ccaggccccc gccaacgtgg ccaagattca gctgcgcctg</b>	<b>180</b>
10	<b>gctgggcaga agaggaagca cagcgagggc cgggtggagg tgtactatga tggccagtgg</b>	<b>240</b>
	<b>ggcaccgtgt gcgatgacga cttctccatc cacgctgcc acgctcgtctg ccgggagctg</b>	<b>300</b>
15	<b>ggctatgtgg aggccaagtc ctggactgac agctcctcct acggcaaggg agaagggccc</b>	<b>360</b>
	<b>atctggttag acaatctcca ctgtactggc aacgaggcga cccttgacg atgcacctcc</b>	<b>420</b>
	<b>aatggctggg gcgtcactga ctgcaagcac acggaggatg tcggtgtggt gtgcagcgac</b>	<b>480</b>
20	<b>aaaaggattc ctgggttcaa atttgacaat tcgttgatca accagataga gaacctgaat</b>	<b>540</b>

25

30

35

40

45

50

55

60

65



atccagggtg aggacattcg gattcgagcc atcctctcaa cctaccgcaa gcgcacccc  
 5 gtgatggagg gctacgtgga ggtgaaggag ggcaagacct ggaagcagat ctgtgacaag 660  
 cactggacgg ccaagaattc ccgcgtggtc tgcggcatgt ttggcttccc tggggagagg 720  
 10 acatacaata ccaaagtgt caaaatgttt gcctcacgga ggaagcagcg ctactggcca 780  
 ttctccatgg actgcaccgg cacagaggcc cacatctcca gctgcaagct gggccccag 840  
 gtgtcactgg accccatgaa gaatgtcacc tgcgagaatg ggctgccggc cgtggtgagt 900  
 15 tgtgtgcctg ggcaggctct cagccctgac ggaccctcga gattccggaa agcatacaag 960  
 ccagagcaac ccctggtgcg actgagaggc ggtgcctaca tcggggaggg ccgcgtggag 1020  
 20 gtgctcaaaa atggagaatg ggggaccgtc tgcgacgaca agtgggacct ggtgtcggcc 1080  
 agtgtggtct gcagagagct gggctttggg agtgccaaag aggcagtac tggtccccga 1140  
 ctggggcaag ggatcggacc catccacctc aacgagatcc agtgcacagg caatgagaag 1200  
 25 tccattatag actgcaagtt caatgccgag tctcagggtc gcaaccacga ggaggatgct 1260  
 ggtgtgagat gcaacacccc tgccatgggc ttgcagaaga agctgcgctt gaacggcggc 1320  
 30 cgcaatccct acgagggccg agtggagggt ctggtggaga gaaacgggtc ccttgtgtgg 1380  
 gggatggtgt gtggccaaaa ctggggcatc gtggaggcca tgggtgtctg ccgccagctg 1440  
 35 ggctgggat tcgccagcaa cgccttcag gagacctggt attggcacgg agatgtcaac 1500  
 agcaacaaag tggatcatgag tggagtgaag tgctcgggaa cggagctgtc cctggcgcac 1560  
 tgccgccacg acggggagga cgtggcctgc ccccagggcg gagtgcagta cggggccgga 1620  
 40 gttgcctgct cagaaaccgc ccctgacctg gtctcaatg cggagatggt gcagcagacc 1680  
 acctacctgg aggaccggcc catgttcagt ctgcagtgtg ccatggagga gaactgcctc 1740  
 45 tcggcctcag ccgcgcagac cgaccccacc acgggctacc gccggctcct gcgcttctcc 1800  
 tcccagatcc acaacaatgg ccagtccgac ttccggcca agaaaggccg ccacgcgtgg 1860  
 atctggcag actgtcacag gcactaccac agcatggagg tgttcacca ctatgacctg 1920  
 50 ctgaacctca atggcaccaa ggtggcagag ggccacaagg ccagcttctg cttggaggac 1980  
 acagaatgtg aaggagacat ccagaagaat tacgagtgtg ccaacttogg cgatcagggc 2040  
 55 atcaccatgg gctgctggga catgtaccgc catgacatcg actgccagtg ggttgacatc 2100  
 actgacgtgc cccctggaga ctacctgttc caggttgta ttaaccccaa cttcgaggtt 2160  
 60 gcagaatccg attactcaa caacatcatg aatgcagga gccgctatga cggccaccgc 2220  
 atctggatgt acaactgcca cataggtgtt tccttcagcg aagagacgga aaaaaagttt 2280  
 gagcacttca gcgggctctt aaacaaccag ctgtccccgc agtaa 2325  
 65

5 <210> 2  
 <211> 774  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 2

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

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

40

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

45

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

50

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

55

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

60

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

65

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

					485					490					495			
5	Gly	Asp	Val	Asn	Ser	Asn	Lys	Val	Val	Met	Ser	Gly	Val	Lys	Cys	Ser		
				500					505					510				
10	Gly	Thr	Glu	Leu	Ser	Leu	Ala	His	Cys	Arg	His	Asp	Gly	Glu	Asp	Val		
			515					520					525					
15	Ala	Cys	Pro	Gln	Gly	Gly	Val	Gln	Tyr	Gly	Ala	Gly	Val	Ala	Cys	Ser		
		530					535					540						
20	Glu	Thr	Ala	Pro	Asp	Leu	Val	Leu	Asn	Ala	Glu	Met	Val	Gln	Gln	Thr		
	545					550					555					560		
25	Thr	Tyr	Leu	Glu	Asp	Arg	Pro	Met	Phe	Met	Leu	Gln	Cys	Ala	Met	Glu		
					565					570					575			
30	Glu	Asn	Cys	Leu	Ser	Ala	Ser	Ala	Ala	Gln	Thr	Asp	Pro	Thr	Thr	Gly		
				580					585					590				
35	Tyr	Arg	Arg	Leu	Leu	Arg	Phe	Ser	Ser	Gln	Ile	His	Asn	Asn	Gly	Gln		
			595					600					605					
40	Ser	Asp	Phe	Arg	Pro	Lys	Asn	Gly	Arg	His	Ala	Trp	Ile	Trp	His	Asp		
		610					615					620						
45	Cys	His	Arg	His	Tyr	His	Ser	Met	Glu	Val	Phe	Thr	His	Tyr	Asp	Leu		
	625					630					635					640		
50	Leu	Asn	Leu	Asn	Gly	Thr	Lys	Val	Ala	Glu	Gly	His	Lys	Ala	Ser	Phe		
				645						650					655			
55	Cys	Leu	Glu	Asp	Thr	Glu	Cys	Glu	Gly	Asp	Ile	Gln	Lys	Asn	Tyr	Glu		
				660					665					670				
60	Cys	Ala	Asn	Phe	Gly	Asp	Gln	Gly	Ile	Thr	Met	Gly	Cys	Trp	Asp	Met		
			675					680					685					
65	Tyr	Arg	His	Asp	Ile	Asp	Cys	Gln	Trp	Val	Asp	Ile	Thr	Asp	Val	Pro		
		690					695					700						
70	Pro	Gly	Asp	Tyr	Leu	Phe	Gln	Val	Val	Ile	Asn	Pro	Asn	Phe	Glu	Val		
	705					710					715					720		
75	Ala	Glu	Ser	Asp	Tyr	Ser	Asn	Asn	Ile	Met	Lys	Cys	Arg	Ser	Arg	Tyr		
				725						730					735			
80	Asp	Gly	His	Arg	Ile	Trp	Met	Tyr	Asn	Cys	His	Ile	Gly	Gly	Ser	Phe		
				740					745					750				

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

10 Asn Gln Leu Ser Pro Gln  
770

15 <210> 3  
<211> 757  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

65

5  
 Glu Gly Ala Val Glu Val Arg Tyr Asp Gly His Trp Arg Gln Val Cys  
 180 185 190

10  
 Asp Gln Gly Trp Thr Met Asn Asn Ser Arg Val Val Cys Gly Met Leu  
 195 200 205

15  
 Gly Phe Pro Ser Gln Thr Ser Val Asn Ser His Tyr Tyr Arg Lys Val  
 210 215 220

20  
 Trp Asn Leu Lys Met Lys Asp Pro Lys Ser Arg Leu Asn Ser Leu Thr  
 225 230 235 240

25  
 Lys Lys Asn Ser Phe Trp Ile His Arg Val Asp Cys Phe Gly Thr Glu  
 245 250 255

30  
 Pro His Leu Ala Lys Cys Gln Val Gln Val Ala Pro Gly Arg Gly Lys  
 260 265 270

35  
 Leu Arg Pro Ala Cys Pro Gly Gly Met His Ala Val Val Ser Cys Val  
 275 280 285

40  
 Ala Gly Pro His Phe Arg Arg Gln Lys Pro Lys Pro Thr Arg Lys Glu  
 290 295 300

45  
 Ser His Ala Glu Glu Leu Lys Val Arg Leu Arg Ser Gly Ala Gln Val  
 305 310 315 320

50  
 Gly Glu Gly Arg Val Glu Val Leu Met Asn Arg Gln Trp Gly Thr Val  
 325 330 335

55  
 Cys Asp His Arg Trp Asn Leu Ile Ser Ala Ser Val Val Cys Arg Gln  
 340 345 350

60  
 Leu Gly Phe Gly Ser Ala Arg Glu Ala Leu Phe Gly Ala Gln Leu Gly  
 355 360 365

65  
 Gln Gly Leu Gly Pro Ile His Leu Ser Glu Val Arg Cys Arg Gly Tyr  
 370 375 380

70  
 Glu Arg Thr Leu Gly Asp Cys Leu Ala Leu Glu Gly Ser Gln Asn Gly  
 385 390 395 400

75  
 Cys Gln His Ala Asn Asp Ala Ala Val Arg Cys Asn Ile Pro Asp Met  
 405 410 415

80  
 Gly Phe Gln Asn Lys Val Arg Leu Ala Gly Gly Arg Asn Ser Glu Glu  
 420 425 430

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5  
 690 695 700  
 10 Asp Val Ala Glu Ser Asp Phe Ser Asn Asn Met Ile Arg Cys Arg Cys  
 705 710 715 720  
 15 Lys Tyr Asp Gly Gln Arg Val Trp Leu His Asn Cys His Thr Gly Asp  
 725 730 735  
 20 Ser Tyr Arg Ala Asn Ala Glu Leu Ser Leu Glu Gln Glu Gln Arg Leu  
 740 745 750  
 25 Arg Asn Asn Leu Ile  
 755

<210> 4  
 <211> 2262  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 4

atgcgacctg tcagtgtctg gcagtgaggc ccctgggggc tgctgctgtg cctgctgtgc 60  
 35 agttegtgct tggggctctcc gtecccttcc acgggccctg agaagaaggc cgggagccag 120  
 gggcttcggt tocggtggc tggcttcccc aggaagccct acgagggccg cgtggagata 180  
 cagcgagctg gtgaatgggg caccatctgc gatgatgact tcacgctgca ggetgcccac 240  
 40 atcctctgcc gggagctggg cttcacagag gccacaggct ggacccacag tgccaaatat 300  
 ggccctggaa caggccgcat ctggctggac aacttgagct gcagtgggac cgagcagagt 360  
 45 gtgactgaat gtgcctcccg gggctggggg aacagtgact gtacgcacga tgaggatgct 420  
 ggggtcatct gcaaagacca ggcctcctt ggcttctcgg actccaatgt cattgaggta 480  
 gagcatcacc tgcaagtgga ggaggtgcca attcgaccocg ccgttgggtg gggcagacga 540  
 50 ccctgcccg tgacggaggg gctggtggaa gtcaggcttc ctgacggctg gtcgcaagtg 600  
 tgcgacaaag getggagcgc ccacaacagc cacgtggtct gcgggatgct gggcttcccc 660  
 agcgaaaaga gggtaacgc ggccttctac aggctgctag cccaacggca gcaacactcc 720  
 55 tttggtctgc atggggtggc gtgctggggc acggaggccc acctctcctt ctgttccttg 780  
 gagttctatc gtgccaatga caccgccagg tgccctgggg ggggccctgc agtggtgagc 840  
 60 tgtgtgccag gcctgtcta cgcggcatcc agtggccaga agaagcaaca acagtcgaag 900  
 cctcaggggg aggcccgtgt ccgtctaaag ggcggcgccc accctggaga gggccgggta 960  
 gaagtccctga aggccagcac atggggcaca gtctgtgacc gcaagtggga cctgcatgca 1020  
 65 gccagcgtgg tgtgtcggga gctgggcttc gggagtgtc gagaagctct gagtggcgtc 1080



5 cgcatggggc agggcatggg tgctatccac ctgagtgaag ttcgctgctc tggacagg;  
 ctctccctct ggaagtgccc ccacaagaac atcacagctg aggattgttc acatagccag 1200  
 gatgccgggg tccggtgcaa cctaccttac actggggcag agaccaggat ccgactcagt 1260  
 10 gggggccgca gccaacatga ggggcgagtc gaggtgcaaa tagggggacc tgggccctt 1320  
 cgctggggcc tcatctgtgg ggatgactgg gggacctgg aggccatggt ggcctgtagg 1380  
 caactgggtc tgggctacgc caaccacggc ctgcaggaga cctggtactg ggactctggg 1440  
 15 aatataacag aggtggtgat gagtggagtg cgctgcacag ggactgagct gtccctggat 1500  
 cagtgtgccc atcatggcac ccacatcacc tgcaagagga cagggacccg cttcactgct 1560  
 20 ggagtcatct gttctgagac tgcatacagat ctggtgctgc actcagcact ggtgcaggag 1620  
 accgcctaca tcgaagaccg gccctgcat atggtgact gtgctgcgga agagaactgc 1680  
 25 ctggccagct cagcccgtc agccaactgg ccctatggtc accggcgtct gctccgatc 1740  
 tcctcccaga tccacaacct gggacgagct gacttcaggc ccaaggctgg gcgccactcc 1800  
 tgggtgtggc acgagtgcca tgggcattac cacagcatgg acatcttcac tcoatgat 1860  
 30 atcctcacc ccaatggcac caaggtggct gagggccaoc aagctagttt ctgtctcgaa 1920  
 gacactgagt gtcaggagga tgtctccaag cggatgagt gtccaactt tggagagcaa 1980  
 35 ggcatactg tgggttgctg ggatctctac cggcatgaca ttgactgtca gtggattgac 2040  
 atcacggatg tgaagccagg aaactacatt ctccaggttg tcatcaacc aaactttgaa 2100  
 40 gtagcagaga gtgactttac caacaatgca atgaaatgta actgcaaata tgatggacat 2160  
 agaatctggg tgcacaactg ccacattggt gatgccttca gtgaagaggc caacaggagg 2220  
 45 tttgaacgct accctggcca gaccagcaac cagattatct aa 2262

<210> 5  
 <211> 1725  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 50 <400> 5

atggctctgg cccgaggcag ccggcagctg ggggccctgg tgtggggcgc ctgcctgtgc 60  
 55 gtgctggtgc acgggcagca ggcgcagccc gggcagggt cggaccccgcc ccgctggcgg 120  
 cagctgatcc agtgggagaa caacgggcag gtgtacagct tgctcaactc gggctcagag 180  
 60 taogtgccgg ccggacctca gcgctccgag agtagctccc ggggtgctgct ggccggcgcg 240  
 ccccaggccc agcagcggcg cagccacggg agccccggc gtcggcagge gccgtccctg 300  
 65 cccctgccgg ggcgcgtggg ctccggacacc gtgcgcggcc aggcgcggca cccattcggc 360

tttggccagg tgcccgacaa ctggcgcgag gtggccgctcg gggacagcac gggcatgg  
 5 ctggcccgca cctccgtctc ccagcaacgg cacgggggct ccgcctctc ggtctcggct 480  
 tcggccttcg ccagcaccta ccgccagcag ccctcctacc cgcagcagtt cccctaccg 540  
 10 caggcgcctt tcgtcagcca gtacgagaac tacgaccccg cgtcgcggac ctacgaccag 600  
 ggtttcgtgt actaccggcc cgcggggcggc ggcgtgggcg cgggggcggc ggcggtggcc 660  
 tcggcggggg tcatctacc ctaccagccc cgggcgcgct acgaggagta cggcggcggc 720  
 15 gaagagctgc ccgagtacc gcctcagggc ttctaccgg cccccgagag gccctacgtg 780  
 ccgccgccgc cgcgcgcgc cgcgcgcgc gaccgccgct actcgcacag tctgtacagc 840  
 20 gagggcacc cgggttcga gcaggcctac cctgaccccg gtcccaggc ggcgcaggcc 900  
 catggcggag acccagcct gggctggtac ccgcctacg ccaaccgcc gcccgaggcg 960  
 25 tacgggccgc cgcgcgcgct ggagccgcc tacctgccg tgcgcagctc cgacacgcc 1020  
 ccgccgggtg gggagcggaa cgggcgcag caggccgcc tcagcgtagg cagcgtgtac 1080  
 cggcccaacc agaaccggcg cggctcctt gacttggtcc cagaccccaa ctatgtgcaa 1140  
 30 gcattcaact atgtgcagag agcccacctg tactcctgc gctgtgctgc ggaggagaag 1200  
 tgtctggcca gcacagccta tgcccctgag gccaccgact acgatgtgcg ggtgctactg 1260  
 35 cgcttcccc agcgcgtgaa gaaccagggc acagcagact tcctcccaa ccggccaegg 1320  
 cacacctgg agtggcacag ctgccaccag cattaccaca gcattggcga gttcagccac 1380  
 40 tacgacctac tggatgcagc cacaggcaag aaggcggccg agggcccaa ggccagttc 1440  
 tgccctggagg acagcacctg tgacttcggc aacctcaagc gctatgcatg cacctctcat 1500  
 accagggcc tgagcccagg ctgctatgac acctacaatg cggacatcga ctgccagtgg 1560  
 45 atcgacataa ccgacgtgca gcctgggaac tacatcctca aggtgcacgt gaaccxaaag 1620  
 tatattggtt tggagtctga cttaccaaac aacgtggtga gatgcaacat tcactacaca 1680  
 50 ggtcgcctac tttctgcaac aaactgcaaa attgtccaat cctga 1725

<210> 6  
 <211> 574  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5  
 Ala Tyr Pro Asp Pro Gly Pro Glu Ala Ala Gln Ala His Gly Gly Asp  
 290 295 300

10  
 Tyr Gly Pro Pro Arg Ala Leu Glu Pro Pro Tyr Ala Asn Pro Pro Glu Ala  
 305 310 315 320

15  
 Ser Asp Thr Pro Pro Pro Gly Gly Glu Arg Asn Gly Ala Gln Gln Gly  
 340 345 350

20  
 Arg Leu Ser Val Gly Ser Val Tyr Arg Pro Asn Gln Asn Gly Arg Gly  
 355 360 365

25  
 Leu Pro Asp Leu Val Pro Asp Pro Asn Tyr Val Gln Ala Ser Thr Tyr  
 370 375 380

30  
 Val Gln Arg Ala His Leu Tyr Ser Leu Arg Cys Ala Ala Glu Glu Lys  
 385 390 395 400

35  
 Cys Leu Ala Ser Thr Ala Tyr Ala Pro Glu Ala Thr Asp Tyr Asp Val  
 405 410 415

40  
 Arg Val Leu Leu Arg Phe Pro Gln Arg Val Lys Asn Gln Gly Thr Ala  
 420 425 430

45  
 Asp Phe Leu Pro Asn Arg Pro Arg His Thr Trp Glu Trp His Ser Cys  
 435 440 445

50  
 His Gln His Tyr His Ser Met Asp Glu Phe Ser His Tyr Asp Leu Leu  
 450 455 460

55  
 Asp Ala Ala Thr Gly Lys Lys Val Ala Glu Gly His Lys Ala Ser Phe  
 465 470 475 480

60  
 Cys Leu Glu Asp Ser Thr Cys Asp Phe Gly Asn Leu Lys Arg Tyr Ala  
 485 490 495

65  
 Cys Thr Ser His Thr Gln Gly Leu Ser Pro Gly Cys Tyr Asp Thr Tyr  
 500 505 510

70  
 Asn Ala Asp Ile Asp Cys Gln Trp Ile Asp Ile Thr Asp Val Gln Pro  
 515 520 525

75  
 Gly Asn Tyr Ile Leu Lys Val His Val Asn Pro Lys Tyr Ile Val Leu  
 530 535 540

80  
 Glu Ser Asp Phe Thr Asn Asn Val Val Arg Cys Asn Ile His Tyr Thr  
 545 550 555 560

85  
 Gly Arg Tyr Val Ser Ala Thr Asn Cys Lys Ile Val Gln Ser  
 565 570

ES 2 440 932 T3

<210> 7  
 <211> 1254  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 7

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45

```

atgcgcttgc cctggaccgt gctcctgctc gggcctttgc agctctgcgc gctagtgcac    60
tgcgcccctc cgcgcgcgg ccaacagcag cccccgcgcg agccgcgcgc ggctccgggc    120
gcctggcgcc agcagatcca atgggagaac aacgggcagg tgttcagctt gctgagcctg    180
ggctcacagt accagcctca ggcgcgcgg gacccgggcg ccgcgcctcc tgggtgcagcc    240
aacgcctcgc cccagcagcc ccgcactccg atcctgctga tccgcgacaa ccgcaccgcc    300
gcggcgcgaa cgcggacggc cggctcatct ggagtcaccg ctggcgcgcc caggcccacc    360
gcccgtcact ggttccaagc tggtactcgc acatctagag ccgcggaagc tgggcgectcgc    420
cgcgcggaga accagacagc gccgggagaa gttcctgcgc tcagtaacct gcggcgcgcc    480
agccgcgtgg acggcatggt gggcgacgac ccttacaacc cctacaagta ctctgacgac    540
aacccttatt acaactacta cgatacttat gaaaggcca gacctggggg caggtaccgg    600
cccggatacg gcactggcta cttccagtac ggtctcccag acctggtggc cgacccctac    660
tacatccagg cgtccacgta cgtgcagaag atgtccatgt acaacctgag atgcgcggcg    720
gaggaaaaot gtctggccag tacagcatac agggcagatg tcagagatta tgatcacagg    780
gtgctgctca gatttcccga aagagtgaag aaccaagga catcagattt cttaccagc    840
cgaccaagat attcctggga atggcacagt tgtcatcaac attaccacag tatggatgag    900
tttagccact atgacctget tgatgccaac acccagagga gagtggctga aggccacaaa    960
gcaagtttct gtcttgaaga cacatcctgt gactatggct accacaggcg atttgcattg    1020
actgcacaca cacagggatt gagtccctggc tgttatgata cctatggtgc agacatagac    1080
tgccagtgga ttgatattac agatgtaaaa cctggaaact atatcctaaa ggtcagtgta    1140
aaccctcagc acctggttcc tgaatctgac tataccaaca atggtgtgcg ctgtgacatt    1200
cgctacacag gacatcatgc gtatgcctca ggctgcacaa tttcaccgta ttag    1254
    
```

<210> 8  
 <211> 417  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 8

50  
 55  
 60  
 65

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



<212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 9

5 Met Arg Pro Val Ser Val Trp Gln Trp Ser Pro Trp Gly Leu Leu Leu  
 1 5 10 15  
 10 Cys Leu Leu Cys Ser Ser Cys Leu Gly Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gly  
 20 20 Cys 20 Gly 25 Ser 30  
 15 Pro Glu Lys Lys Ala Gly Ser Gln Gly Leu Arg Phe Arg Leu Ala Gly  
 35 35 Lys 35 Gly 40 Arg 45  
 20 Phe Pro Arg Lys Pro Tyr Glu Gly Arg Val Glu Ile Gln Arg Ala Gly  
 50 50 Phe 50 Tyr 55  
 25 Glu Trp Gly Thr Ile Cys Asp Asp Asp Phe Thr Leu Gln Ala Ala His  
 65 65 Cys 70 Thr 75 His 80  
 30 Ile Leu Cys Arg Glu Leu Gly Phe Thr Glu Ala Thr Gly Trp Thr His  
 75 75 Arg 85 Thr 90 His 95  
 35 Ser Ala Lys Tyr Gly Pro Gly Thr Gly Arg Ile Trp Leu Asp Asn Leu  
 100 100 Tyr 105 His 110  
 40 Ser Cys Ser Gly Thr Glu Gln Ser Val Thr Glu Cys Ala Ser Arg Gly  
 115 115 Ser 120 His 125  
 45 Trp Gly Asn Ser Asp Cys Thr His Asp Glu Asp Ala Gly Val Ile Cys  
 130 130 Asn 135 His 140  
 50 Lys Asp Gln Arg Leu Pro Gly Phe Ser Asp Ser Asn Val Ile Glu Val  
 145 145 Arg 150 His 155  
 55 Glu His His Leu Gln Val Glu Glu Val Arg Ile Arg Pro Ala Val Gly  
 165 165 Thr 170 His 175  
 60 Trp Gly Arg Arg Pro Leu Pro Val Thr Glu Gly Leu Val Glu Val Arg  
 180 180 Arg 185 His 190  
 65 Leu Pro Asp Gly Trp Ser Gln Val Cys Asp Lys Gly Trp Ser Ala His  
 195 195 Asp 200 His 205  
 70 Asn Ser His Val Val Cys Gly Met Leu Gly Phe Pro Ser Glu Lys Arg  
 210 210 His 215 His 220  
 75 Val Asn Ala Ala Phe Tyr Arg Leu Leu Ala Gln Arg Gln Gln His Ser  
 225 225 Tyr 230 His 235  
 80 Phe Gly Leu His Gly Val Ala Cys Val Gly Thr Glu Ala His Leu Ser  
 245 245 Thr 250 His 255  
 85 Leu Cys Ser Leu Glu Phe Tyr Arg Ala Asn Asp Thr Ala Arg Cys Pro  
 260 260 Tyr 265 His 270



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

5  
 Ala Ser Ser Gly Gln Lys Lys Gln Gln Gln Ser Lys Pro Gln Gly Glu  
 290 295 300

10  
 Ala Arg Val Arg Leu Lys Gly Gly Ala His Pro Gly Glu Gly Arg Val  
 305 310 315 320

15  
 Glu Val Leu Lys Ala Ser Thr Trp Gly Thr Val Cys Asp Arg Lys Trp  
 325 330 335

20  
 Asp Leu His Ala Ala Ser Val Val Cys Arg Glu Leu Gly Phe Gly Ser  
 340 345 350

25  
 Ala Arg Glu Ala Leu Ser Gly Ala Arg Met Gly Gln Gly Met Gly Ala  
 355 360 365

30  
 Ile His Leu Ser Glu Val Arg Cys Ser Gly Gln Glu Leu Ser Leu Trp  
 370 375 380

35  
 Lys Cys Pro His Lys Asn Ile Thr Ala Glu Asp Cys Ser His Ser Gln  
 385 390 395 400

40  
 Asp Ala Gly Val Arg Cys Asn Leu Pro Tyr Thr Gly Ala Glu Thr Arg  
 405 410 415

45  
 Ile Arg Leu Ser Gly Gly Arg Ser Gln His Glu Gly Arg Val Glu Val  
 420 425 430

50  
 Gln Ile Gly Gly Pro Gly Pro Leu Arg Trp Gly Leu Ile Cys Gly Asp  
 435 440 445

55  
 Asp Trp Gly Thr Leu Glu Ala Met Val Ala Cys Arg Gln Leu Gly Leu  
 450 455 460

60  
 Gly Tyr Ala Asn His Gly Leu Gln Glu Thr Trp Tyr Trp Asp Ser Gly  
 465 470 475 480

65  
 Asn Ile Thr Glu Val Val Met Ser Gly Val Arg Cys Thr Gly Thr Glu  
 485 490 495

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento de determinación del carácter maligno de tejido de mama canceroso, comprendiendo el procedimiento:
- determinar el nivel de expresión y/o actividad de LOR-1 del tejido de mama canceroso; y  
comparar dicho nivel de expresión y/o actividad de LOR-1 con el determinado para el tejido de control para  
10 determinar de este modo el carácter maligno del tejido de mama canceroso, en el que un incremento en el nivel de  
expresión y/o actividad de LOR-1 se correlaciona con el carácter maligno.
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que se determina dicho nivel de expresión de LOR-1.
- 15 3. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que dicha determinación es mediante la utilización de un anticuerpo anti-LOR-1 o fragmento del mismo que se une a LOR-1.
4. Procedimiento, según la reivindicación 3, en el que el anticuerpo anti-LOR-1 se genera utilizando un fragmento C-terminal de 200 aminoácidos de un polipéptido LOR1.

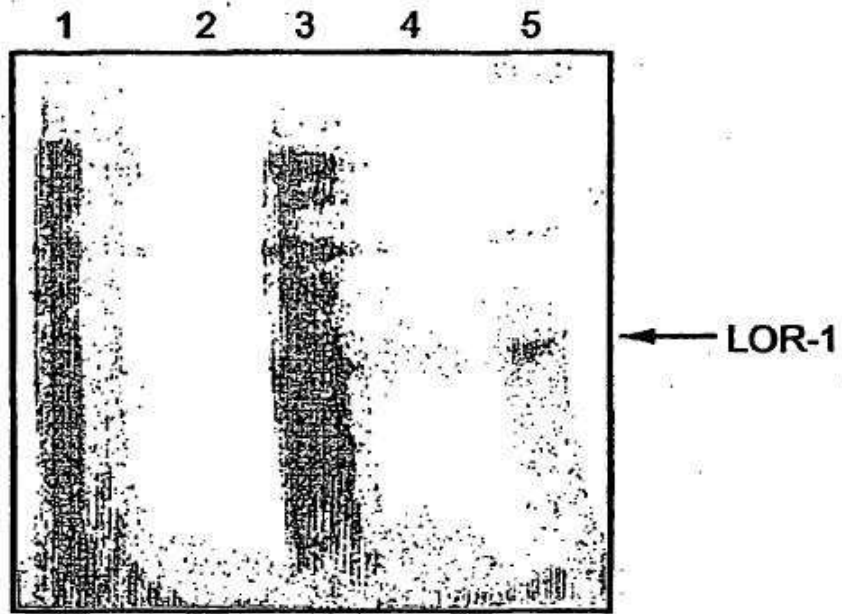


Figura 1

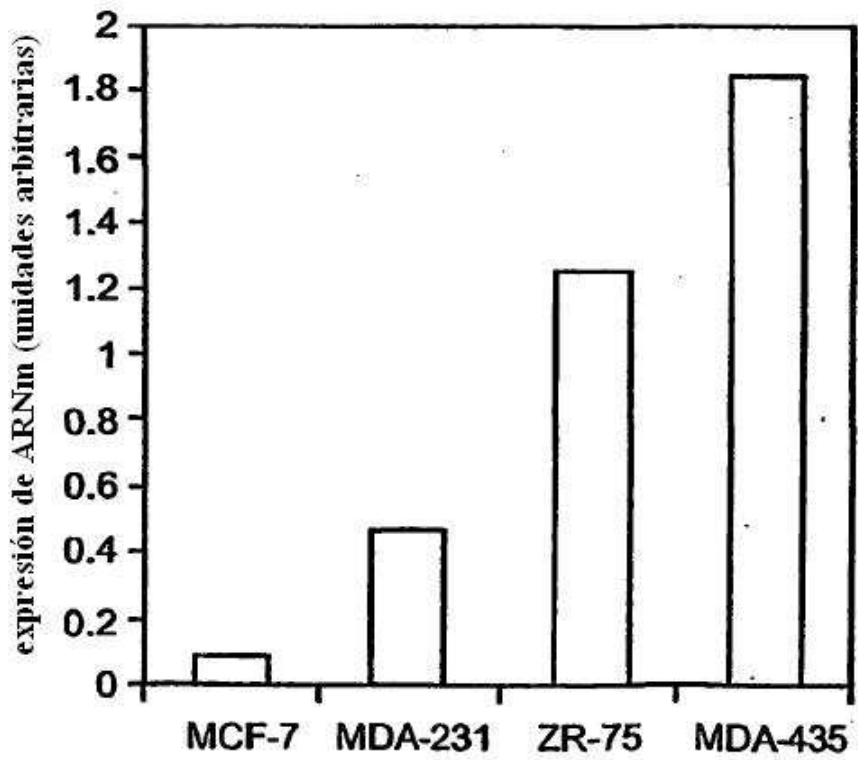


Figura 2

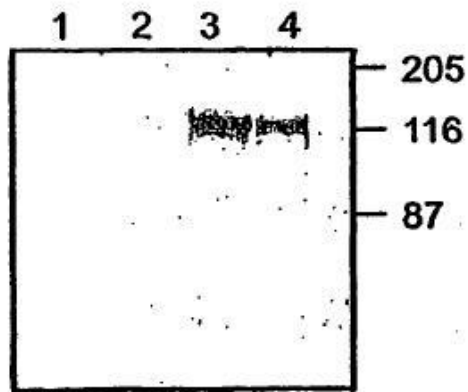


Figura 3

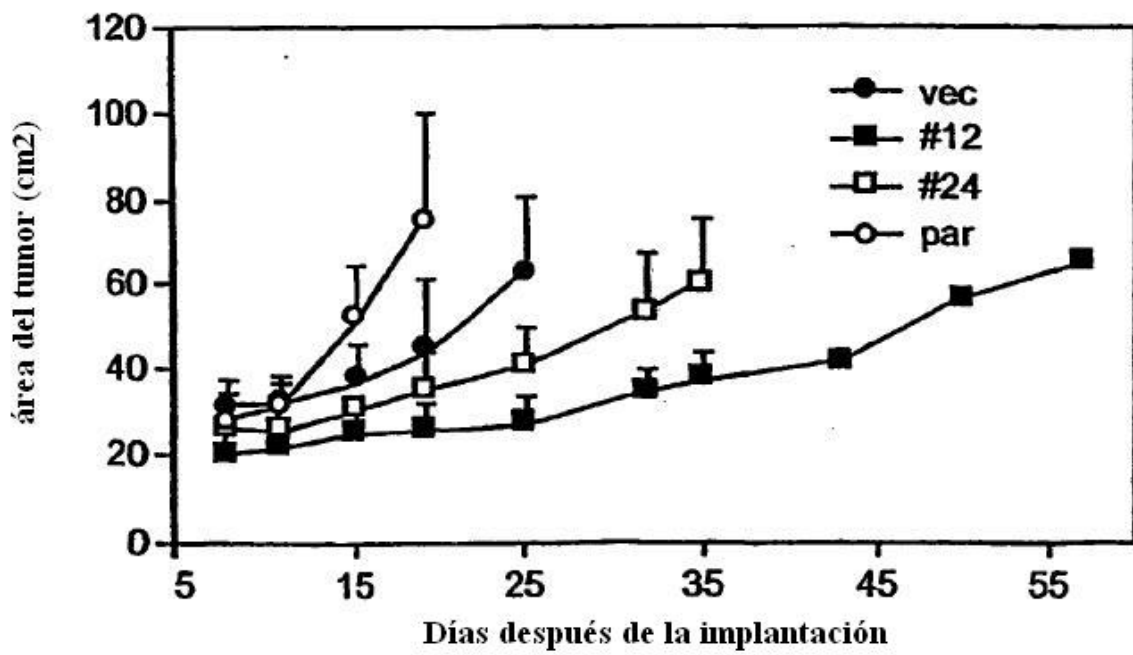
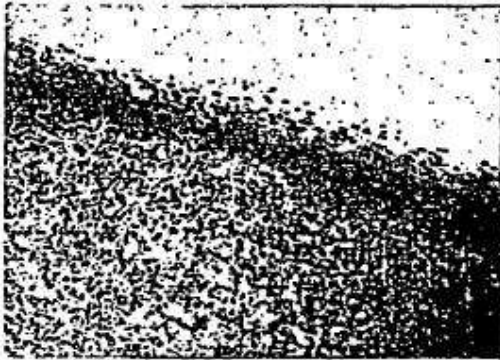


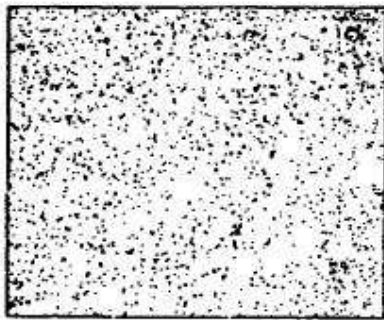
Figura 4



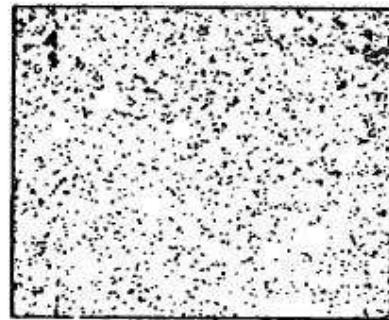
**Figura 5a**



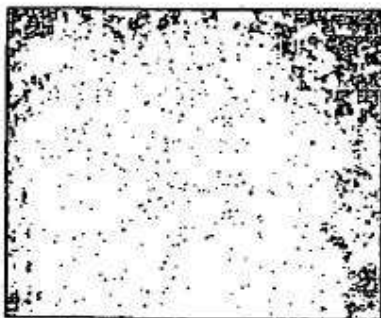
**Figura 5b**



**Figura 6a**



**Figura 6b**



**Figura 6c**



**Figura 6d**



**Figura 7**

1 MERPLCSHLCGLAMLALLSPSLAQYDSWPHY...PEYFCQAPPEYHQPOAPANVAKIQIQLIAGCQRKKSSEGSRVEVY 70  
 BLOR-1  
 BLOR-2  
 LexC  
 hLcL  
 hLQ  
 consensus>50

80 YDGGVGVCCDDDFSIHAKVIVCRRLGVVZPKSRTASISYVKGEGPIWLDMLHCGIENEAATLAAGTENGWGVTDCKRITEDVVG 130  
 BLOR-1  
 BLOR-2  
 LexC  
 hLcL  
 hLQ  
 consensus>50

160 VVSDKRIPIGKFDNSLINGIENLNIQVEDIEIRAIISTYRKRTPVMEGVVVEKGGKTKKQICDKKNTAKNERIVVCGMFG 210  
 BLOR-1  
 BLOR-2  
 LexC  
 hLcL  
 hLQ  
 consensus>50

240 PPGERTYVTKVTK...KIPASIKQRVWPPSMDCTETAPAISSKILGRQVSLDPMKNVTCENGLPAAVVSQV 290  
 BLOR-1  
 BLOR-2  
 LexC  
 hLcL  
 hLQ  
 consensus>50

Figura 8





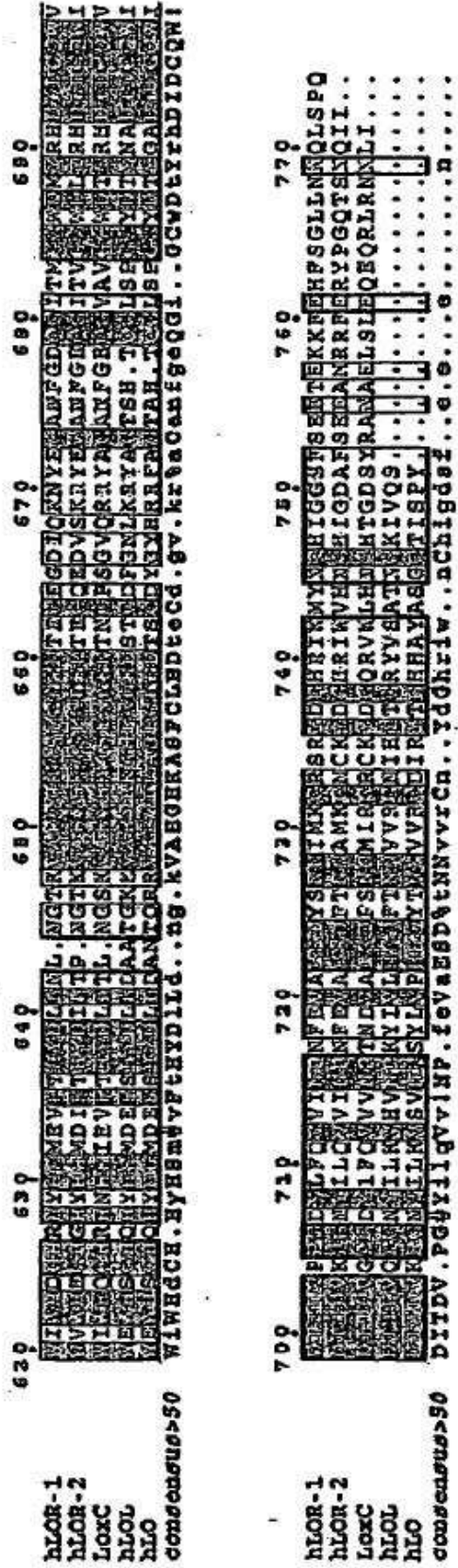


Figura 8 (continuación)